

Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Obor: Biologie



Úloha trehalózy v mykorhizních asociacích

The role of trehalose in mycorrhizal associations

Jan Šoch

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert
Konzultant: Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování:

Na úvod této práce chci poděkovat mému školiteli RNDr. Janu Ponertovi a mé konzultantce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a čas, který mi při psaní této práce věnovali. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině a mým blízkým, jejichž podpora byla pro vznik této práce neméně důležitá.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2015

Podpis:

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Vlastnosti a biosyntéza trehalózy	1
1.2. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát v metabolismu rostlin	3
1.3. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát v metabolismu hub	6
2. Mykorrhiza	6
2.1. Role trehalózy v ektomykorrhizní symbióze	7
2.2. Role trehalózy v endomykorrhizní symbióze	13
2.2.1. Arbuskulární mykorrhiza	14
2.2.2. Erikoidní mykorrhiza	18
2.2.3. Orchideoidní mykorrhiza a mykoheterotrofie	19
2.3. Obecná role trehalózy v mykorrhizních asociacích	22
3. Parazitismus	23
3.1. Parazité rostlin z říše Fungi	23
3.2. Houbové organismy parazitující na rostlinách	26
3.3. Další parazité rostlin	28
3.4. Obecná role trehalózy v parazitických interakcích	29
4. Závěr	30
Použitá literatura	31

Abstrakt

Mykorhizní symbióza je v přírodě velmi rozšířený fenomén. Mezi symbionty dochází k translokaci živin, přičemž velmi důležitou úlohu v tomto procesu hraje disacharid trehalóza. Tento sacharid však také plní řadu důležitých funkcí v metabolismu hub i rostlin. U hub trehalóza slouží především jako zásobní a transportní sacharid. V metabolismu rostlin naproti tomu trehalóza funguje jako signální molekula, a to již v extrémně malých množstvích. Je tedy pravděpodobné, že na fyzickém rozhraní mezi symbionty by tento sacharid mohl sloužit houbám k ovlivnění metabolismu rostliny. Obdobnou úlohu trehalóza patrně zastává v řadě parazitických interakcí. Ve většině typů mykorhizních asociací vytváří syntéza trehalózy v myceliu uhlíkový sink, který vede k přesunu sacharidů z rostliny. Zcela odlišná situace nastává v těch typech mykorhizní symbiózy, kde rostlina získává sacharidy z houbového symbionta. Některé rostliny totiž dokážou trehalózu účinně využít i jako jediný zdroj energie. Zde se proto otevírá otázka, zda by takové rostliny nemohly trehalózu z houbového symbionta cíleně získávat právě i jako zdroj energie a uhlíku. Tato literární rešerše si klade za cíl výše nastíněné možnosti zhodnotit a diskutovat s ohledem na dostupné literární zdroje.

Klíčová slova:

mykorhiza, orchideje, parazitismus, sacharidy, sink, symbióza, translokace, trehalóza, trehalóza-6-fosfát

Abstract

Mycorrhizal symbiosis is a widely spread phenomenon in nature. A translocation of nutrients occurs between symbionts with disaccharide trehalose playing a key role in the process. However, this saccharide fulfils many important roles in metabolism of fungi and plants. Fungi use trehalose mainly as storage and transport saccharide. On the other hand, trehalose occurs in extremely low amounts in plants where it acts as a signal molecule. Thus it is likely that the saccharide could be used by the fungus to manipulate plant metabolism on a physical interface between symbionts. Trehalose has a similar function in many parasitic interactions. In most cases of mycorrhizal associations trehalose synthesis creates a carbon sink in mycelium which leads to saccharide transfer from the host plant to the fungus. Completely different situation occurs in the types of mycorrhizal symbiosis, where saccharides are translocated from a fungus to a plant. Some plants can utilize trehalose effectively as a sole source of energy. Consequently, the question raises – could such plants gain fungal trehalose on purpose as a source of energy and carbon? This review aims to assess and discuss the mentioned possibilities considering available literature.

Key words:

mycorrhiza, orchids, parasitism, saccharides, sink, symbiosis, translocation, trehalose, trehalose-6-phosphate

Seznam použitých zkratk:

1-SFT	sacharóza:fruktan-6-fruktosyltransferáza
1-SST	sacharóza:sacharóza-1-fruktosyltransferáza
ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
ADPG-pyrofosforyláza	adenosindifosfát-glukóza pyrofosforyláza
AM	arbuskulárně mykorhizní
AmTP	TP u muchomůrky <i>Amanita muscaria</i>
AmTPP	TPP u muchomůrky <i>Amanita muscaria</i>
AmTPS	TPS u muchomůrky <i>Amanita muscaria</i>
ATP	adenosintrifosfát
AtTRE1	trehaláza u huseníčku <i>Arabidopsis thaliana</i>
Bur-0	genotyp huseníčku rolního označovaný Burren-0
DSE	dark septate endophyte – skupina endofytních hub charakteristická melanizovanými a přehrádkovanými hyfami
ECM	ektomykorhizní
ErM	erikoidně mykorhizní
G6P	glukóza-6-fosfát
GH32	Glycosyl Hydrolase 32 – genová rodina kódující glykosylhydrolázy
GiNTH1	neutrální trehaláza u AM houby <i>Glomus intraradices</i>
GiTPS	TPS u AM houby <i>Glomus intraradices</i>
GiTPS2	TPS2 u AM houby <i>Glomus intraradices</i>
MHB	mycorrhiza helper bacteria – bakterie pozitivně stimuluje vznik mykorhizní symbiózy a kolonizaci kořenů mykorhizními houbami
NMR	nukleární magnetická rezonance
NTH1	neutrální trehaláza
PAL	fenylalanin-amoniak lyáza
PbTPS	TPS u nádorovky <i>Plasmodiophora brassicae</i>
Pi	anorganický fosfát
PLB	protocorm-like body – protokormům podobné útvary
PPi	pyrofosfát
QTL test	quantitative trait locus test – test analyzující lokusy kvantitativních znaků
<i>ripTPS</i>	gen kódující TPS u bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i>
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction – reverzní transkripce následovaná kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí
T6P	trehalóza-6-fosfát
TP	trehalózafosforyláza
TPP	trehalózafosfátfosfatáza
TPS	trehalózafosfátsyntáza
UDP	uridindifosfát
UDP-glukóza	uridindifosfát-glukóza
UDPG-pyrofosforyláza	uridindifosfát-glukóza pyrofosforyláza
UTP	uridintrifosfát

Poznámka:

Způsob značení proteinů a genů není v literatuře zcela unifikován, proto upřesním typ značení použitý v této práci. Zkratky proteinů jsou psány rovným písmem a počáteční písmeno je vždy velké (např. AmTPS). Zkratky genů jsou psány kurzívou (např. *treYZ*). Názvy mutantů s nefunkčním genem jsou psány malým písmem a kurzívou, případně označeny velkým řeckým písmenem delta (např. $\Delta tps1$).

1. Úvod

Mykorhizní symbióza představuje vztah mezi rostlinami a houbami. Charakter této symbiózy se pohybuje mezi mutualismem a parazitismem. Parazitické sklony přitom mohou mít oba symbionti. V případě, že se jedná o mutualismus, získává většinou houba od rostliny uhlíkaté látky pocházející z fotosyntézy a houba naopak zajišťuje rostlině větší přísun dusíku, fosforu a vody. Svou roli v tomto přesunu sehrává i trehalóza, tedy disacharid, který má v metabolismu obou symbiontů značný význam. Celkově je však o úloze trehalózy v mykorhizní symbióze v současné době známo poměrně málo. Relativně dobře prostudována je úloha trehalózy při tvorbě uhlíkového sinku v mykorhizovaných kořenech. Uhlíkový sink je rezervoár akumulující uhlíkaté látky. Trehalóza a její intermediát trehalóza-6-fosfát (T6P) se u rostlin silně uplatňují v signalizaci, například pokud jde o metabolismus sacharidů, a tedy je nasnadě uvažovat i o širším významu tohoto disacharidu v mykorhizovaných pletivech. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o úloze trehalózy v mykorhizní symbióze a některých čistě parazitických interakcích mezi rostlinami a houbami. Kapitola věnující se parazitismu má za úkol především ilustrovat manipulační potenciál exogenní trehalózy v metabolismu rostlin. V kontextu těchto informací vyvstává řada otázek. Je možné, aby houbová trehalóza ovlivňovala metabolismus rostlin i při mykorhizní symbióze? A v jaké míře k tomu případně dochází? Může naopak v některých mykorhizních interakcích trehalóza figurovat v negativním vlivu rostliny na mykorhizní houbu? Další otázka se otevírá ohledně toho, zda obsah trehalózy v mykorhizovaných pletivech může indikovat charakter symbiotické interakce. Tyto otázky budu diskutovat v závislosti na dostupných zdrojích. Už jen vzhledem k tomu, že mykorhizní symbióza byla zaznamenána u většiny studovaných rostlin, včetně těch hospodářsky významných (Selosse a Le Tacon 1998), se jeví téma této práce jako hodné řešení.

1.1. Vlastnosti a biosyntéza trehalózy

Trehalóza, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid, je neredukující disacharid sestávající ze dvou glukózových podjednotek spojených glykosidickou vazbou. Z vlastností této molekuly je třeba zmínit její silné osmoprotektivní účinky. Bylo opakovaně pozorováno, že trehalóza chrání membrány a proteiny před negativním vlivem osmotického stresu (Crowe et al. 1984; Albertorio et al. 2007; da Costa Morato Nery et al. 2008). Tato schopnost trehalózy je využívána řadou organismů v obraně proti extrémním teplotám, přítomnosti volných radikálů i suchu (např. Drennan et al. 1993; da Costa Morato Nery et al. 2008).

Poprvé byla tato sloučenina popsána u kokonů některých pouštních brouků v oblasti bývalé Perské říše (Hanbury 1859). V perštině pro tento sacharid, považovaný někdy za biblickou manu (Paul et al. 2008), existuje výraz schakar tugal, což v překladu znamená „cukr z hnízd“

(Hanbury 1859). V turečtině existuje pro tuto sladkou složku kokonů pojem tréhalá, od kterého je odvozen dnes používaný termín trehalóza (Hanbury 1859). Dlouho je též známa přítomnost trehalózy u hub, zejména u kvasinek (Koch a Koch 1925), ale i u mykorhizních hub (např. Lewis a Harley 1965a; Wannet et al. 1998). Až do roku 1998 se předpokládalo, že rostliny, až na několik poikilohydrických druhů, trehalózu nesyntetizují, přestože schopnost syntézy a degradace trehalózy byla známa u pylu některých rostlin, a též byla známa schopnost pylových láček trehalózu využít (Gussin et al. 1969; Gussin a McCormack 1970).

V roce 1998, před kterým už řada pozorování naznačovala schopnost rostlin tento disacharid syntetizovat (např. Goddijn et al. 1997), byly objeveny geny pro biosyntézu trehalózy u huseničky *Arabidopsis thaliana* (Blázquez et al. 1998; Vogel et al. 1998). Z dalších studií se ukázalo, že geny pro biosyntézu trehalózy jsou u rostlin dobře konzervované a tvoří poměrně rozsáhlé genové rodiny (Leyman et al. 2001; Avonce et al. 2006; Lunn 2007; Yang et al. 2012).

Důvodem, proč nebyla trehalóza dříve u rostlin většinou identifikována, je velmi nízké množství, ve kterém se v metabolismu rostlin vyskytuje (Lunn et al. 2006; Martins et al. 2013; Carillo et al. 2013). Naopak schopnost rostlin degradovat trehalózu byla známa dlouho. Předpokládalo se, což se do jisté míry i později potvrdilo, že degradace trehalózy je důležitá pro obranu rostliny proti některým patogenům. Jak bude diskutováno v dalších kapitolách, trehalóza a její intermediát trehalóza-6-fosfát mají v metabolismu rostlin a hub celou řadu funkcí. Dnes je známo, že k syntéze trehalózy dochází u všech organismů vyjma obratlovců, kteří ji ale jsou schopni degradovat. Degradace trehalózy je u naprosté většiny organismů katalyzována enzymem trehalázou za vzniku dvou molekul glukózy. Oproti tomu drah vedoucích k syntéze trehalózy je více. Pro biosyntézu trehalózy existuje pět běžných a několik vzácnějších drah.

Biosyntetická dráha OtsA-OtsB je v živé přírodě nejběžnější. Vyskytuje se u bakterií (De Smet et al. 2000), archebakterií (Zaparty et al. 2013), bezobratlých živočichů (Candy a Kilby 1961; Murphy a Wyatt 1965), u hub (např. Leloir a Cabib 1953; Cabib a Leloir 1958; López et al. 2007), i jiných organismů (Brodmann et al. 2002) a představuje výhradní způsob biosyntézy trehalózy u rostlin (např. Blázquez et al. 1998, Vogel et al. 1998; Leyman et al. 2001; Yang et al. 2012). Zmíněná biosyntetická dráha probíhá takto (obr. č. 1):

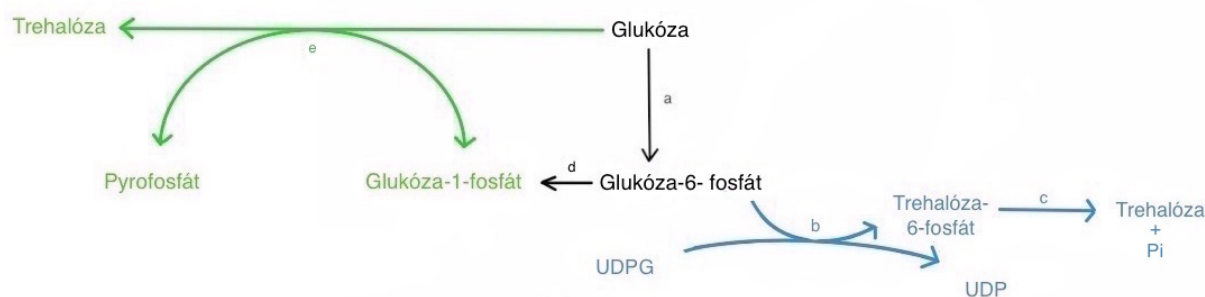
uridindisfosfátglukóza (UDP-glukóza) + glukóza-6-fosfát \rightarrow urididifosfát (UDP) + trehalóza-6-fosfát \rightarrow trehalóza + anorganický fosfát (Pi), přičemž přenesení glukózové jednotky na glukóza-6-fosfát katalyzuje enzym trehalózafosfátsyntáza (TPS) a odštěpení fosfátu z T6P enzym trehalózafosfátfosfatáza (TPP).

Druhou drahou, jež je relevantní pro tuto práci, představuje dráha TreP. Tato dráha je přítomná u některých zástupců říše Rhizaria (Belocopitow a Maréchal 1970), u bakterií (Kizawa

et al. 1995) a vyskytuje se u hub, jako například u pečárky *Agaricus bisporus* (Wannet et al. 1998), muchomůrky *Amanita muscaria* (López et al. 2007), či ektomykorhizní houby *Cenococcum geophilum* (Kerner et al. 2012). U rostlin se tato dráha nevyskytuje. Reakce je katalyzována enzymem trehalózafosforylázou a probíhá následovně (obr. č. 1):

Glukóza-1-fosfát + glukóza \rightleftharpoons trehalóza + Ppi (pyrofosfát). Tato reakce může probíhat oběma směry (Wannet et al. 1998), ale za fyziologických podmínek pravděpodobně funguje většinou ve směru syntézy trehalózy (López et al. 2007). Další dráhy vedoucí k syntéze trehalózy se vyskytují pouze u prokaryotických organismů (např. Elbein et al. 1968; Nishimoto et al. 1995; Nakada et al. 1995; Nishimoto et al. 1996; Maruta et al. 1996; De Smet et al. 2000; Qu et al. 2004; Djonović et al. 2013), a pro tuto práci tak nejsou podstatné. Jedná se o dráhy TreT, TreY-TreZ a TreS.

Obr. č. 1: Schéma biosyntézy trehalózy u hub a u rostlin



Zeleně je vyznačena houbová dráha TreP, modře je vyznačena dráha OtsA-OtsB přítomná u hub i u rostlin; a – hexokináza, b – trehalózafosfátsyntáza, c – trehalózafosfátfosfatáza, d – fosfoglukomutáza, e – trehalózafosforyláza; Pi – anorganický fosfát, UDP – uridindifosfát, UDPG – uridindifosfát-glukóza

1.2. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát v metabolismu rostlin

Rostliny, jak bylo zmíněno výše, syntetizují trehalózu přes intermediát trehalóza-6-fosfát (T6P). Tento intermediát má v metabolismu rostlin velmi důležitou úlohu a jeho přítomnost je podmínkou správného růstu a vývoje. Nelze vyloučit, že signál může generovat jak trehalóza, tak i T6P, nicméně dosavadní výsledky naznačují, že efekty trehalózy jsou zprostředkovány signalizací T6P (např. Schleupmann et al. 2004; Delatte et al. 2011).

Nejdéle pozorovanou schopností trehalózy je schopnost zmírňovat dopady osmotického stresu na metabolismus rostlin, i jiných organismů. V metabolismu rostlin dochází vlivem sucha,

extrémních teplot, či solí ke zvyšování obsahu trehalózy. U některých poikilohydrických rostlin dochází k akumulaci trehalózy ve velkých množstvích, např. u tzv. „resurrection plants“, rostlin schopných přežít dlouhá období sucha. Patří mezi ně např. *Myrothamnus flabellifolia* (Bianchi et al. 1993; Drennan et al. 1993) z oddělení Magnoliophyta, či vraneček *Selaginella lepidophylla* (Adams et al. 1990) z oddělení Lycopodiophyta. U těchto rostlin pravděpodobně trehalóza slouží přímo k protekci membrán a proteinů zejména ve stavu anabiózy (Crowe et al. 1984; Albertorio et al. 2007; da Costa Morato Nery et al. 2008). U většiny rostlin se ale trehalóza vyskytuje v nanomolárních množstvích (Lunn et al. 2006; Carillo et al. 2013; Martins et al. 2013) a případnému zvýšení obsahu tak nejspíše nelze přisuzovat osmoprotektivní úlohu. Přesto bylo mnohokrát pozorováno, že trehalóza se podílí na odpovědi rostlin na stres, případně že zvýšení obsahu trehalózy metodami genového inženýrství vede k vyšší odolnosti rostlin ke stresu. Zvýšení obsahu trehalózy bylo pozorováno například u huseníčku *Arabidopsis thaliana* (Kaplan et al. 2004; Carillo et al. 2013), u některých kultivarů pšenice *Triticum aestivum* (El-bashiti et al. 2005), či u kapary trnité *Capparis ovata* (Ilhan et al. 2015) vystavených suboptimálním i supraoptimálním teplotám, či u rýže *Oryza sativa* při stresu zasolení NaCl (Garcia et al. 1997). Genetické modifikace vedoucí ke zvýšení hladiny trehalózy zvýšily odolnost například u rýže *O. sativa* (Jang et al. 2003), či kukuřice *Zea mays* (Rodríguez-Salazar et al. 2009). Dráhy regulující biosyntézu T6P a trehalózy interagují s drahami spojenými s reakcemi rostlin na abiotický i biotický stres (Brodmann et al. 2002; Jang et al. 2003; Schluempmann et al. 2004; Yang et al. 2012) a biosyntéza trehalózy tudíž bývá pozměněna i v případě biotického stresu, jak bude diskutováno dále.

Klíčovým metabolitem je pravděpodobně trehalóza-6-fosfát. Vysoký obsah trehalózy vede pravděpodobně ke ovlivnění obsahu T6P (Wingler et al. 2000; Schluempmann et al. 2004; Delatte et al. 2011). Obsah trehalóza-6-fosfátu oproti tomu koreluje s celkovou bilancí sacharidů, zejména pak s hladinou sacharózy (Wingler et al. 2000; Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006; Martins et al. 2013; Yadav et al. 2014), jejíž zvyšující se hodnoty vedou k akumulaci T6P. Tento metabolit tak pravděpodobně reflektuje energetickou bilanci rostliny a do jisté míry reguluje utilizaci sacharidů v závislosti na tomto stavu (Lunn et al. 2006; Ramon et al. 2007; Martins et al. 2013; Lunn et al. 2014; Yadav et al. 2014). Vzhledem k zmíněnému propojení trehalózy a T6P je tedy zřejmé, že trehalóza má též význam v reflexi dostupnosti sacharidů. Na úlohu obou těchto metabolitů, zejména na úlohu T6P, ukazuje pozorování, že mutantní rostliny neschopné biosyntézy T6P jsou embryoletální, přičemž vývoj embrya se zastavuje v torpédovitém stádiu (Eastmond et al. 2002; Gómez et al. 2006). Důvodem pro tuto letalitu je patrně úloha T6P v regulaci metabolismu škrobu, což je dosud asi nejlépe prostudovaná funkce T6P v metabolismu rostlin vůbec. Obsah škrobu je trehalóza-6-fosfátem kontrolován

jak na úrovni exprese genů biosyntézy a degradace škrobu (Wingler et al. 2000; Ramon et al. 2007), tak na enzymatické úrovni. T6P nejspíše indukuje změnu redoxního stavu prvního enzymu biosyntézy škrobu ADPG-pyrofosforylázy (adenosindifosfát-glukóza pyrofosforyláza; Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006; Delatte et al. 2011; Paul et al. 2010; Martins et al. 2013; Yadav et al. 2014). Vysoký obsah T6P vede k akumulaci škrobu stimulací jeho syntézy a inhibicí jeho degradace. V *tps1* mutantních embryích tak nedochází k degradaci deponovaného škrobu (Gómez et al. 2006). Trehalóza-6-fosfát a trehalóza jsou důležité i v řadě dalších procesů ve vývoji a metabolismu rostlin, kde většinou působí ve výrazně menším množství. Bylo například pozorováno zvýšení míry fixace CO₂ u rostlin tabáku *Nicotiana tabacum*, geneticky upravených tak, že syntetizovaly větší množství T6P (Pellny et al. 2004). Tento účinek T6P však nebyl pozorován u *A. thaliana* (Martins et al. 2013). Rostliny s nedostatkem T6P nejsou schopny květní indukce (van Dijken et al. 2004; Gómez et al. 2006), což může souviset s pozorovaným propojením mezi T6P a cirkadiálním rytmem rostliny (Martins et al. 2013). Dále je známa úloha trehalózy v biosyntéze buněčné stěny (Veluthambi et al. 1982b; Gómez et al. 2006; Paul et al. 2010), kde patologický obsah trehalózy vede k ultrastrukturálním změnám v buněčné stěně. Signalizační dráhy trehalózy také interagují s fytohormony. Biosyntéza trehalózy je pravděpodobně pod vlivem cytokininů (Brenner et al. 2005), ale dochází i k nepřímým interakcím signalizační dráhy trehalózy a T6P s kyselinou abscisovou (Ramon et al. 2007; van Houtte et al. 2013), či auxiny (Paul et al. 2010). Právě s kyselinou abscisovou (ABA) souvisí další známá funkce trehalózy. Bylo pozorováno, že ABA zvyšuje míru exprese genu AtTRE1 pro trehalázu ve svěracích buňkách průduchů a částečně i tímto způsobem snižuje otevřenost průduchů (Van Houtte et al. 2013).

Zajímavá je diverzifikace genových rodin kódujících TPS a TPP u rostlin (Leyman et al. 2001; Avonce et al. 2006; Lunn 2007; Yang et al. 2012). Různé homologní geny jsou exprimovány ve specifické míře v konkrétních pletivech a patrně se liší ve své funkci (Avonce et al. 2006; Yang et al. 2012) a celá situace tak bude patrně velmi složitá. Trehaláza je minimálně u huseníčku *A. thaliana* s největší pravděpodobností enzym vázaný na plasmalemu s katalytickou doménou orientovanou do apoplastu (Frison et al. 2007), což vede k řadě dalších nejasností. Lze totiž pouze spekulovat o tom, jakým způsobem je obsah trehalózy regulován a jakým způsobem je trehalóza transportována přes cytoplasmatickou membránu. Není navíc znám mechanismus transportu intracelulární trehalózy mezi buňkami a buněčnými kompartmenty (Lunn et al. 2014).

Je zde také třeba zmínit, že většina výše zmíněných poznatků byla získána studiem na huseníčku *A. thaliana*, přičemž tato rostlina velmi pravděpodobně mykorhizní asociace nevytváří (Veiga et al. 2013).

1.3. Trehalóza a trehalóza-6-fosfát v metabolismu hub

Vzhledem k tomu, že jednotlivé taxonomické skupiny hub a i jednotlivé kmeny hub se velmi odlišují na úrovni metabolismu, a vzhledem k tomu, že na této úrovni velmi různě reagují na podobné abiotické a biotické podmínky, bude téma úlohy trehalózy v metabolismu hub šířeji pojednáno v dalších kapitolách věnujících se jednotlivým typům mykorhizních asociací. Dalším důvodem pro toto uspořádání je též fakt, že úloha trehalózy v mykorhizní symbióze je lépe prostudována u hub účastnících se této symbiózy, než u rostlin. Zde jen stručně zmíním některé známé úlohy trehalózy v metabolismu hub.

Trehalóza se u hub vyskytuje v relativně velkých množstvích, a to i u těch mykorhizních (např. Lewis a Harley 1965a; Schubert et al. 1992; Wannet et al. 2000). U většiny druhů představuje snadno utilizovatelný cukr, který je využíván jako rychlý, i jako zásobní zdroj energie. Je známa i úloha tohoto sacharidu v sexuální i asexuální reprodukci některých hub (Bécard et al. 1991; Wannet et al. 2000; Lowe et al. 2009, Song et al. 2014). Trehalóza také pomáhá u některých druhů s navozením turgoru v hyfových špičkách (Foster et al. 2003). Dlouho je též známo, že trehalóza a T6P hrají roli v odpovědi hub na abiotický stres (Ocón et al. 2007; da Costa Morato Nery et al. 2008; Lowe et al. 2009). T6P, jak bylo pozorováno u některých druhů kvasinek, může regulovat v metabolismu hub aktivitu hexokináz (Blázquez et al. 1993).

K tomu dochází konkrétně tak, že T6P za fyziologických podmínek může inhibovat hexokinázy a tímto mechanismem regulovat první krok glykolýzy. Tento mechanismus regulace glykolýzy trehalóza-6-fosfátem u rostlin s největší pravděpodobností není přítomný (Eastmond et al. 2002; Martins et al. 2013).

2. Mykorhiza

Nejdéle známou úlohou trehalózy v mykorhizní symbióze je její účast na tvorbě přídavného uhlíkového sinku. U všech typů mykorhizních symbióz, kdy houba získává uhlík a energii z rostliny, je pro houbového symbionta nutné v mykorhizních kořenech tvořit uhlíkový sink (např. McKendrick et al. 2000; López et al. 2007). Rostlinné hexózy jsou pro ten účel v mykorhizách konvertovány na látky specifické pro metabolismus hub, které se v rostlinách vyskytují omezeně nebo jsou rostlinou obtížněji metabolizovatelné (Lewis a Harley 1965a,b,c; Martin et al. 1985, Martin et al. 1998; López et al. 2007). Kromě trehalózy se jedná o sacharidy manitol, erythritol, glykogen, či arabitol (Niederer et al. 1989; Schaeffer et al. 1995; Martin et al. 1998). Obsah jednotlivých sacharidů se u různých hub velice liší, a to jak v závislosti na abiotických vlivech (např. Tibbett et al. 2002), tak na taxonomické příslušnosti hub (Söderström et al. 1988; Koide et al. 2000).

Zcela jinou se jeví situace v těch typech mykorhizních symbióz, kde dochází k přesunu

uhlíkatých látek směrem z houbového do rostlinného symbionta, jako je tomu například v orchideoidním typu mykorrhizy (např. Alexander a Hadley 1985). Je však velmi pravděpodobné, že trehalóza a T6P mají i další úlohy ve vztahu mykorrhizních partnerů. Z tohoto hlediska se jeví jako podstatný nedostatek prací vzniklých před rokem 1998 fakt, že se o existenci biosyntézy trehalózy u většiny rostlin neuvažovalo. Při identifikaci a stanovení obsahu sacharidů v nemykorrhizovaných rostlinách se byl naměřen buďto nulový, nebo minimální obsah trehalózy. Pozitivní výsledek výskytu trehalózy byl zpravidla interpretován jako důsledek kontaminace mikroby, či endofytickými houbami. Například Lewis a Harley (1965c) po přidání [¹⁴C]trehalózy do média pro nekolonizované kořeny *Fagus sylvatica* zaznamenali [¹⁴C]O₂ vydychávaný rostlinou. Tento výsledek autoři přisoudili mikrobiální enzymatické činnosti, ačkoliv tato trehalóza mohla být hydrolyzována rostlinnou trehalázou, vzniklá glukóza mohla být využívána a následně vydychána ve formě oxidu uhličitého. Je s podivem, že recentní práce týkající se mykorrhizní symbiomy většinou schopnost rostlin syntetizovat trehalózu také nezohledňují.

V důsledku zmíněné nevědomosti o metabolismu trehalózy u rostlin není také zcela jisté, zda trehalóza naměřená v řadě studií byla původu houbového, či rostlinného. Jelikož však rostliny trehalózu většinou neakumulují v podobně velkém množství (Lunn et al. 2006; Carillo et al. 2013; Martins et al. 2013), zatímco houby ano (např. Martin et al. 1985; Wannet et al. 2000), a také protože v mykorrhizách dochází u hub k výraznému zvýšení exprese genů účastnících se biosyntézy trehalózy (López et al. 2007), je pravděpodobnější houbový původ trehalózy.

V následující kapitole bude diskutována zejména úloha trehalózy na tvorbě sinku v mykorrhizovaných kořenech, která je nejlépe prostudována. Pokusím zohlednit i celkovou situaci ohledně metabolismu cukrů v mykorrhizní symbióze. Dále bude rozebírána úloha trehalózy v odpovědi mykorrhizovaných kořenů na změny různých abiotických faktorů.

2.1. Role trehalózy v ektomykorrhizní symbióze

Hlavní úlohou trehalózy je i v ektomykorrhizní symbióze, alespoň dle dostupných informací, tvorba přídavného sinku houbovým symbiontem v mykorrhizovaných kořenech (např. López et al. 2007). K syntéze trehalózy patrně dochází v myceliu, což v mykorrhizovaných kořenech vytváří silný hexózový gradient vedoucí k přesunu sacharidů z rostliny do houby (Lewis a Harley 1965b, López et al. 2007). Místem, kde v ektomykorrhize patrně k přesunu látek dochází, je Hartigova síť (López et al. 2007). V mykorrhizních kořenech se vlivem tvorby sinku snižuje zejména koncentrace glukózy, fruktózy a sacharózy (Schaeffer et al. 1995). Ty mohou být využity k syntéze trehalózy, či jiných metabolitů, čímž houbový symbiont vytváří sink.

Uvedenou představu podporuje také zjištění, že vznik ektomykorhizní asociace bývá doprovázen zvýšením obsahu trehalózy (např. Lewis a Harley 1965a). Pro další průběh symbiotické interakce je charakteristické kolísání obsahu trehalózy, které reflektuje proměnlivost rychlosti růstu mycelia (Niederer 1989, Corrêa et al. 2011). Je pravděpodobné, že vlivem zvýšené potřeby sacharidů v rostoucím myceliu dochází k posílení syntézy trehalózy v myceliu v mykorhizních kořenech (Corrêa et al. 2011). Přednostní úloze trehalózy v tvorbě uhlíkového sinku odpovídá i to, že houby z různých rozpustných sacharidů přednostně přijímají glukózu (Lewis a Harley 1965b; Chen a Hampp 1993). Právě glukóza je u hub výchozí látkou syntézy trehalózy (např. Wannet et al. 1998).

Pro osvětlení pozadí vztahu mezi mykorhizními symbionty je zásadní pochopení částečně se překrývajícího metabolismu sacharidů, a to především dynamiky přeměny sacharidů, na fyzickém rozhraní mezi oběma symbionty. Řada studií došla pomocí NMR (nuclear magnetic resonance) spektroskopie k podobným výsledkům ohledně inkorporace značeného uhlíku do mycelia, přičemž všechny práce ukázaly větší či menší změny v obsahu trehalózy v myceliu před a po kolonizaci rostliny (Lewis a Harley 1965a,b; Niederer et al. 1989; Martin et al. 1998). Sérii pionýrských experimentů provedli Lewis a Harley v 60. letech 20. století (Lewis a Harley 1965a,b,c). Zjistili jednak pomocí NMR spektroskopie a jednak pomocí papírové chromatografie změny v zastoupení rostlinných i houbových sacharidů pod vlivem mykorhizace u buku *Fagus sylvatica*. V mykorhizních kořenech inkubovaných v glukózovém roztoku pozorovali vzrůst obsahu trehalózy a sacharózy a ověřili tento výsledek za využití [¹⁴C]glukózy přidané do růstového média. Většina značeného uhlíku byla zabudována do nerozpustných sacharidů, především do glykogenu, o něco méně do sacharidů rozpustných, ve kterých ale byla velká část značeného uhlíku zabudována do trehalózy. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že v tomto případě trehalóza tvoří přídavný houbový sink. Potvrzení těchto pozorování přinesly i studie dalších autorů. Po přidání značené glukózy do média ektomykorhizním kořenům smrku *Picea abies* byl největší podíl značeného uhlíku mezi rozpustnými sacharidy zaznamenán v trehalóze (Niederer et al. 1989). Trehalóza vykazovala asi dvě třetiny aktivity, dále došlo ke značení manitolu, glukózy, sacharózy, fruktózy a arabitolu (Niederer et al. 1989). Přidání [¹³C]glukózy do růstového média vedlo v myceliu ECM (ektomykorhizní) houby měcháče *Pisolithus tinctorius* neasociovaném s jeho rostlinným symbiontem blahovičником *Eucalyptus globulus* k zabudování značeného uhlíku do manitolu, trehalózy, glutaminu a alaninu; méně pak do arabitolu, erythritolu a glutamátu. V mykorhizovaných kořenech *E. globulus* bylo množství uhlíku zabudovaného do trehalózy oproti tomu téměř dvojnásobné, a je tak patrné, že rychlost syntézy trehalózy se mění v reakci na vznik mykorhizní symbiózy (Martin et al. 1998). Nasvědčuje tomu i další pozorování, kdy byla myceliu ektomykorhizní houby lišky

Cantharellus cibarius dodána do růstového média značená glukóza, jakožto simulace rostlinné glukózy. Téměř polovina značeného uhlíku byla v myceliu inkorporována do trehalózy a argininu (Rangel-Castro et al. 2002). Přesnější náhled na přesun uhlíku v rámci ektomykorhizní symbiózy přineslo pozorování inkorporace značeného uhlíku z $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ u několika druhů borovice *Pinus* (Söderström et al. 1988). Hlavními $[^{14}\text{C}]$ sacharidy v ECM houbách byly trehalóza, manitol a arabitól, a to v různém poměru u klouzku *Suillus bovinus*, měcháče *Pisolithus tinctorius* a čechratky *Paxillus involutus*. U *S. bovinus* byl nejzastoupenějším značeným sacharidem arabitól, o něco nižší bylo značení manitolu. Nejmenší aktivitu vykazovala trehalóza, ta ovšem nabývala nejvyššího obsahu mezi neznačenými cukry. Další dva druhy inkorporovaly značený uhlík v odlišných poměrech, patrně kvůli různým metabolickým úlohám jednotlivých sacharidů u různých druhů hub (Söderström et al. 1988). Část variability v reakci mykorhizních hub na změnu podmínek by mohla být vysvětlena tím, že autoři použili v této studii více druhů rostlin. Kromě toho byly rostliny v tomto pokusu vystaveny značenému oxidu uhličitému 5-7 dní, a teprve potom analyzovány, což by mohlo výsledky nepříznivě ovlivnit, jelikož nejrychlejší přesun uhlíku z rostlinných asimilátů do mycelia houbového symbionta patrně může probíhat už mezi 8-24 hodinou od začátku fixace CO_2 (Leake et al. 2001). Pozorování přesunu značeného uhlíku do trehalózy v ektomykorhizní symbióze je konzistentní i s naměřením vyšší abundance transkriptů genů pro biosyntézu trehalózy v mykorhizním myceliu (López et al. 2007).

Akumulace trehalózy ale může mít i jiný význam, např. vytváření energetické rezervy. Odpovídá tomu několik pozorování. Například u klouzku *Suillus bovinus* má trehalóza nejvyšší zastoupení ze sacharidů krátkodobě neovlivněných přísunem rostlinných asimilátů (Söderström et al. 1988). Stejná studie ukázala vysoký obsah trehalózy i ve sklerociích čechratky *Paxillus involutus*. Trehalóza tak má v metabolismu ECM hub pravděpodobně i roli zásobní.

Tím, že v kolonizovaných kořenech vzniká přídavný sink, dochází k ovlivnění metabolismu sacharidů rostliny. Nejvíce bývá ovlivněna hladina sacharózy, přičemž zvýšení obsahu trehalózy více méně odráží snížení obsahu sacharózy (např. Lewis a Harley 1965b; Schaeffer et al. 1995). V ektomykorhizách *Eucalyptus globulus* (Martin et al. 1998), dochází ke snížení obsahu sacharózy, i rychlosti její syntézy. Ke snížení obsahu sacharózy v mykorhizních kořenech dochází i u smrku *Picea abies* (Schaeffer et al. 1995). Existence sinku je také do jisté míry podmíněna zvětšením poolu uhlíkatých látek (Kaschuk et al. 2009). Například v prýtu borovice *Pinus pinaster* kolonizované ECM houbou *Pisolithus tinctorius*, byl naměřen vzestup syntézy sacharózy indikovaný i poklesem obsahu fruktóza-2,6-bisfosfátu (Corrêa et al. 2011). Dochází tedy ke zvýšení alokace uhlíku do podzemních částí rostliny. Koresponduje s tím i dvaapůlkrát vyšší rychlost inkorporace exogenní $[^{14}\text{C}]$ glukózy dodané mykorhizovaným bukům

do sacharózy a fruktózy, oproti kořenům bez houbového symbionta (Lewis a Harley 1965b).

Jak bylo uvedeno výše, hlavním zdrojem uhlíku pro mykorrhizní houby jsou exogenní, resp. rostlinné hexózy (Martin et al. 1985). Přenos sacharidů z asimilujících částí rostliny do kořenů většinou probíhá prostřednictvím disacharidu sacharózy. Ta je v místech spotřeby štěpena enzymem invertázou na fruktózu a glukózu. V rámci mykorrhizních kořenů semenáčků *Picea abies* je asi polovina invertázové aktivity lokalizována v apoplastu kortexu (Schaeffer et al. 1995), tedy v místě, které je dobře přístupné myceliu mykorrhizní houby. Aplikace značené [¹⁴C]sacharózy pomocí agarových bločků přiložených k izolovaným mykorrhizním kořenům buku, vedla v ektomykorrhizách k nejvyšší inkorporaci značeného uhlíku do sacharózy, trehalózy a manitolu (Lewis a Harley 1965c). Situace se ale lišila podle vzdálenosti od kořenové špičky. Autoři této studie odlišují tři zóny podle fixní vzdálenosti od vrcholu kořene: bazální část (úsek dlouhý 2 mm a vzdálený 7 mm od špičky kořene, bez kontaktu s hyfovým pláštěm), střední část (úsek dlouhý 3 mm, vzdálený od špičky 5 mm, sestávající se jak z rostlinného pletiva, tak z hyfového pláště) a apikální část (prvních 5 mm od kořenové špičky, skládající se z hyfového pláště a z pletiva rostliny). Nejvyšší aktivita sacharózy byla pozorována v apikální části, a to v rostlinném pletivu. V hyfovém plášti apikální části byl obsah sacharózy minimální, nejvyšší aktivitu zde naopak vykazovaly manitol a trehalóza. Ve střední části kořene byla aktivita manitolu a trehalózy pozorovatelně nižší (Lewis a Harley 1965c). Tato studie neuvádí, která z výše uvedených zón reprezentuje kterou ze čtyř zón kořene – zda zónu diferenciaci, zónu prodlužovací, zónu buněčného dělení, či kořenovou čepičku. Výsledky však ukazují na rapidnější přesun sacharózy a její konverzi na houbové metabolity v apikální části, oproti části střední. Největší síla sinku v kořenových špičkách ektomykorrhizních kořenů byla pozorována i u vrby *Salix repens* a břízy *Betula pendula* (McKendrick et al. 2000). K pochopení situace dále přispívá to, že v elongační zóně kořene byla pozorována největší aktivita kyselých invertáz, která je stimulována i tamtéž lokalizovaným kyselým růstem (Schaeffer et al. 1995). Je pravděpodobné, že apikální zóna mykorrhizních kořenů buku zmíněná v předešlém odstavci zahrnovala také celou elongační zónu. Právě v elongační zóně tedy může docházet k hydrolýze sacharózy, konverzi hexózy na trehalózu a tvorbě majoritní části sinku. Ačkoliv přídavný sink vytvořený mykorrhizní houbou nezpůsobuje zvýšení invertázové aktivity, je potenciál aktivity invertáz v mykorrhizách vyšší díky tamějšímu sníženému množství fruktózy, která má na invertázu inhibiční vliv (Schaeffer et al. 1995). Jasnější chápání tvorby uhlíkového sinku s ohledem na roli trehalózy v ektomykorrhizní symbióze, umožnila precizní disekce Hartigových sítí a hyfových plášťů od rostlinného pletiva v ektomykorrhizní asociaci mezi topolem *Populus tremula* × *P. tremuloides* a ECM houbou *Amanita muscaria* a následné určení míry exprese genů zahrnutých do biosyntézy trehalózy v jednotlivých částech ektomykorrhiz (López et al.

2007). Tato studie je v současnosti jediná, která se expresí genů biosyntézy trehalózy v reakci na vznik mykorhizní symbiózy detailně zabývá. V separované Hartigově síti byla oproti myceliu extraradikálnímu pozorována zvýšená exprese genů pro AmTPS (18krát), AmTPP (3,5krát) a AmTP (4krát) a též i vyšší enzymatická aktivita AmTPS (7,4krát) a větší obsah trehalózy (2,7krát). Hartigova síť je tak v mykorhize zřejmě místem tvorby uhlíkového sinku vlivem syntézy trehalózy (López et al. 2007). Zároveň je patrné z poměru aktivity zmíněných enzymů (Schaeffer et al. 1995), že v mykorhizních kořenech muselo docházet k akumulaci trehalóza-6-fosfátu. Nabízí se tedy i možnost, ačkoliv nebyla autory testována, že T6P byl exudován do rostlinných pletiv, ve kterých by mohl ovlivňovat metabolismus rostliny ve prospěch ECM houby (např. Wingler et al. 2000; Eastmond et al. 2002; Kolbe et al. 2005; Martins et al. 2013). Nerovnoměrnost v míře exprese genů pro enzymy syntetizující trehalózu a aktivitě těchto enzymů mezi intraradikálním a extraradikálním myceliem (López et al. 2007) by v rámci mycelia houby mohla vést primárně k tvorbě sinku v extraradikálním myceliu a tím i k přenosu trehalózy do extraradikálního mycelia, jak bylo podobně navrženo u endomykorhizních asociací (např. Bago et al. 2003 – viz následující kapitola). Může tomu nasvědčovat i aktivita houbové kyselé trehalázy v této ektomykorhizní symbióze. Ta byla v mykorhizním myceliu muchomůrky oproti myceliu neasociovanému se symbiotickým topolem naměřena pouze šestinová (Wisser et al. 2000).

Většina mykorhizních hub postrádá geny pro invertázy a jsou tak závislé na invertázách rostlinných. Z mnoha testovaných mykorhizních hub mělo GH32 (Glycosyl Hydrolase 32 – EC 3.2.1.) geny pro invertázy pouze pět druhů, a to ektomykorhizních i endomykorhizních: *Elaphomyces cf. verruculosus*, *Meliniomyces bicolor*, *Phialophora finlandica*, *Rhizoscyphus ericae* a *Sebacina incrustans* (Parrent et al. 2009). Ze dvou plně osekvenovaných ektomykorhizních hub jedna postrádá invertázy (*Laccaria bicolor*; Kuo et al. 2014) a druhá má vlastní invertázu (*Tuber melanosporum*; Ceccaroli et al. 2011). Invertázová aktivita však byla naměřena i u jiných druhů ECM hub (Hughes a Mitchell 1995). Počet paralogů GH32 genů je oproti tomu v rámci říše Fungi vysoký u rostlinných patogenů, lichenizovaných hub a endofytů. Počet kopií těchto genů je kromě ekologické strategie druhu závislý i na jeho fylogenetické pozici (Parrent et al. 2009). Druhy hub, které postrádají invertázy, jsou tedy alespoň z části závislé na „uvolení“ rostliny, bez kterého mají menší přísun rostlinných hexóz, nemohou z nich tedy tak intenzivně syntetizovat trehalózu a nemohou tedy ani vytvářet příliš silný sink. Zůstává ale otázkou, do jaké míry může mykorhizní houba sama ovlivňovat přeměnu rostlinných hexóz na trehalózu a tím i sílu sinku (Salzer a Hager 1993). Případně zda jedinou rolí trehalózy je tvorba sinku, či jestli nějakým způsobem ovlivňuje metabolismus rostliny ve prospěch mykorhizní houby (Wiemken 2007). Proti tomu stojí například pozorování,

že invertázová aktivita u mykorrhizních kořenů *Picea abies* se se zvětšením síly sinku nezvyšuje (Schaeffer et al. 1995).

Kontrast podmínek s vysokým a nízkým množstvím dostupných sacharidů v médiu poskytovaném mykorrhizním kořenům *Fagus sylvatica* ukazuje, že vysoký obsah sacharidů vede k masivnější inkorporaci značeného uhlíku do trehalózy a opačný účinek má na syntézu manitolu. Na druhé straně nízký obsah sacharidů v médiu vede ke zvýšené tvorbě glykogenu, a to v poměru až 4:1 k tvorbě trehalózy (Lewis and Harley 1965b). Pravděpodobně je tedy trehalóza v přirozených podmínkách syntetizována hlavně v periodách s vysokým množstvím dostupných cukrů. Mohou tomu nasvědčovat i výsledky terénního měření obsahu sacharidů v ektomykorrhizách borovice *Pinus resinosa* v různých ročních obdobích, resp. v obdobích s různým teplotním průměrem. Tato měření ukázala, že obsah trehalózy stoupá v chladných obdobích, spolu s obsahem glukózy, fruktózy a sacharózy, zatímco v teplých obdobích se akumulují sacharidy manitol a myo-inositol (Koide et al. 2000). I když mohlo vlivem změny teploty dojít ke změně řady parametrů, autoři toto pozorování vysvětlují primárně tak, že chladné období vedlo k vyšší dostupnosti rostlinných sacharidů (Koide et al. 2000). Během chladného období rostlina může skutečně akumulovat sacharidy jako odpověď na stres (Secks et al. 1999; Kaplan et al. 2004). Této představě dále odpovídají výsledky testování vlivu nízkých teplot na obsah sacharidů v izolovaných myceliích šesti druhů ECM hub: *Amanita rubescens*, *Canecoccum geophilum*, *Lactarius affinis*, *Leccinum aurantiacum*, *Pisolithus tinctorius*. Pouze mycelium *Amanita rubescens* na sníženou teplotu reagovalo zvýšením obsahu trehalózy; *Tylopilus*, *Pisolithus* a *Lactarius* dokonce vykazovaly při nižších teplotách snížený obsah trehalózy (Koide et al. 2000). V případě, že se množství dostupných sacharidů v období s nižšími teplotami zvyšuje, může být zvýšená míra syntézy trehalózy v takových obdobích spíše reakcí houby na lepší dostupnost rostlinných cukrů, než na sníženou teplotu (Koide et al. 2000). Trehalóza tak má v těchto podmínkách pravděpodobně zásobní charakter. V období, kdy dochází k oteplení a rostlina investuje většinu svých živin do vývoje a růstu fotosyntetických orgánů, může být uložená trehalóza v myceliu použita k jeho růstu (Koide et al. 2000).

Tato reakce však nemusí být univerzální. U osmi kmenů ektomykorrhizní houby rodu *Hebeloma* pocházejících z různých biotů (arktická tundra, tajga, temperátní les a chladný temperátní les) byl totiž naměřen nejvyšší obsah trehalózy (2,5% sušiny) a manitolu (0,5% sušiny) při nízkých teplotách (Tibbett et al. 2002). Výskyt a zvýšený obsah těchto látek jsou tak pravděpodobně dány nejen dostupností cukrů a druhem houby (Koide et al. 2000), ale dílem i jeho tolerancí k nižším teplotám (Tibbett et al. 2002). Trehalóza by zde mohla fungovat jako látka protektivní, chránící buněčné stěny rostlin i hub, před dehydratací způsobenou nízkými

teplotami (Crowe et al. 1984; Koide et al. 2000). Na obsah trehalózy mohou mít vliv i jiné faktory. Sucho, resp. nízký vodní potenciál vede v ektomykorhizách ke snížení obsahu trehalózy, jak bylo pozorováno u mykorhizních kořenů *Fagus sylvatica* (Shi et al. 2002). Obsah trehalózy však u některých ECM hub v reakci na sucho naopak pravděpodobně stoupá. U *Cenococcum geophilum* byla po vystavení suchu naměřena výrazně větší exprese genu kódujícího enzym trehalózafosforylázu (Kerner et al. 2012).

Obsah trehalózy v mykorhizních kořenech může být použit i jako indikátor kvality, resp. vitality mykorhiz. Procento intaktních, turgidních, mladých a celkově vitálních mykorhiz totiž silně koreluje s mírou syntézy trehalózy v rámci mykorhiz (Niederer et al. 1989). Tato metoda by tak podle autorů mohla nahradit tradiční morfologické hodnocení kvality mykorhiz, které je méně přesné.

Trehalóza může být důležitá i pro zlepšení růstu ektomykorhizních hub vlivem bakterií (Duponnois a Kisa 2006; Deveau et al. 2010). Například na růst a odolnost mycelia ektomykorhizní houby *Laccaria bicolor* a na vznik mykorhizní asociace má pozitivní vliv MHB (mycorrhiza helper bacteria) bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Houba vylučuje do okolí jak z intaktního, tak z porušeného mycelia trehalózu, a ta zlepšuje životaschopnost bakterií. Bakterie v této symbiotické interakci napomáhají houbě tím, že vylučují vitamín thiamin, popřípadě i další pro houbu pozitivní látky (Björkman 1960; Deveau et al. 2010).

2.2. Role trehalózy v endomykorhizní symbióze

Sacharid trehalóza představuje významnou součást metabolismu také u endomykorhizních hub, i rostlin (Stribley a Read 1974; Schubert et al. 1992; Bécard et al. 1991; Ocón et al. 2007). Úloha trehalózy se ale různí mezi jednotlivými typy endomykorhiz, přičemž nejzásadnějším rozdílem je patrně směr toku uhlíkatých látek mezi symbionty. Zatímco u arbuskulární a erikoidní mykorhizy probíhá přesun uhlíkatých látek převážně z rostlinných pletiv do mycelia endomykorhizní houby (Stribley a Read 1974; Hughes a Mitchell 1995; Shachar-Hill et al. 1995; Bago et al. 2003), u orchideoidní a monotropoidní mykorhizy, kde je rostlina alespoň zpočátku svého života heterotrofní (Björkman 1960; Trudell et al. 2003; Bougoure et al. 2010; Bougoure et al. 2014), probíhá alespoň v této fázi přesun uhlíkatých látek převážně směrem opačným, tedy z houbového symbionta do symbionta rostlinného (Björkman 1960; Smith 1967; Hadley a Purves 1974; Alexander a Hadley 1985; Bougoure et al. 2010; Bougoure et al. 2014). Po vytvoření fotosyntetického aparátu se ale tok uhlíku mezi symbionty může měnit, jak bylo ukázáno u *Goodyera repens* (Cameron et al. 2006).

Nejlépe prostudovaná situace ohledně dynamiky metabolismu sacharidů v endomykorhizní symbióze je u arbuskulární mykorhizy. Nejméně jsou naopak prozkoumány metabolické procesy

u monotropoidní mykorhizy, arbutoidní mykorhizy a DSE (dark septate endophyte). U těchto tří typů mykorhizní symbiózy poznatky o biosyntéze trehalózy dosud chybí, a proto budou v následujícím textu vynechány. Vzhledem k tomu, že u monotropoidní mykorhizy jde většinou o do různé míry parazitický vztah vedoucí k heterotrofii či mixotrofii rostliny (Björkman 1960; Trudell et al. 2003), lze očekávat, že situace bude do jisté míry podobná jako u orchideoidní mykorhizy. Celou problematiku mykoheterotrofie proto zahrnu ve stručné podobě do kapitoly orchideoidní mykorhiza. Arbutoidní mykorhiza by mohla pravděpodobně vykazovat charakter na pomezí endomykorhizní a ektomykorhizní symbiózy, soudě pouze podle morfologie mykorhiz (Lancellotti et al. 2014). Některé arbutoidně mykorhizní rostliny jsou však do různé míry mykoheterotrofní (Hynson et al. 2009), a proto by mohla být situace podobná i monotropoidní, či orchideoidní symbióze. V následující části se zaměřím odděleně na arbuskulární, erikoidní a orchideoidní typ endomykorhizy.

2.2.1. Arbuskulární mykorhiza

Kořeny rostlin kolonizované arbuskulárně mykorhizními houbami vykazují vyšší obsah trehalózy, než kořeny houbami nekolonizované. V kořenech bez mykorhiz většinou obsah trehalózy buďto nebyl naměřen, pravděpodobně v důsledku nedostatečně citlivých metod, nebo byla přítomnost trehalózy vysvětlena jako důsledek kontaminace endofytickými houbami, či aktivity mikrobů v rhizoplánu (Shachar-Hill et al. 1995; Schubert et al. 1992). Zatímco u ostatních typů mykorhiz byla přítomnost trehalózy u houbového symbionta pozorována už v dřívějších letech, například už v 60. letech u ektomykorhizní (Lewis a Harley 1965a,b,c), či orchideoidní symbiózy (Smith 1967), u arbuskulární mykorhizy byla pozorována až v 90. letech (Bécard 1991, Schubert 1992). Pravděpodobně tomu tak bylo kvůli poměrně nižšímu obsahu trehalózy v intraradikálním i extraradikálním myceliu oproti ostatním typům mykorhizní symbiózy (Bécard et al. 1991, Schubert et al. 1992). Svou úlohu na této nerovnoměrnosti může mít i výrazně obtížnější práce s arbuskulárně mykorhizními houbami, které nelze kultivovat bez rostlinného symbionta.

Obsah trehalózy v mykorhizovaných kořenech a její poměrné zastoupení k dalším rozpustným sacharidům se liší mezi konkrétními arbuskulárně mykorhizními asociacemi, pravděpodobně v závislosti na taxonomii obou symbiontů (Schubert et al. 1992) a abiotických podmínkách (Ocón et al. 2007). V arbuskulárně mykorhizních kořenech aksamitníku *Tagetes tenuifolia* kolonizovaných houbou *Glomus versiforme* představovala trehalóza 4,4 % všech rozpustných sacharidů, u kořenů sóji *Glycine max* mykorhizovaných AM (arbuskulárně mykorhizní) houbou *Glomus mossae* pak 1,6 % (Schubert et al. 1992). Většina trehalózy v arbuskulárně mykorhizních kořenech je pravděpodobně původem z houbového symbionta,

vzhledem k množství trehalózy, které se vyskytuje ve volně rostoucích arbuskulárně mykorhizních houbách (Bécard 1991, Schubert 1992). V plodnicích *Glomus versiforme* a *Glomus mossae* představuje trehalóza hlavní rozpustný sacharid (Schubert et al. 1992). Ve sporách arbuskulárně mykorhizní houby *Gigaspora margarita* tvořila trehalóza 1,13 % sušiny, ve sporách *Glomus intaradix* 0,06 % a ve sporách *Glomus etunicatum* 1,60 % sušiny (Bécard et al. 1991). Výsledky těchto měření ukazují na důležitou roli tohoto sacharidu v metabolismu arbuskulárně mykorhizních hub. Z uvedených výsledků je také patrné, že jednou z pravděpodobných rolí trehalózy v růstu a vývoji AM hub je patrně poskytování energie během klíčení spor (Bécard et al. 1991). Po klíčení spor totiž dochází k výraznému úbytku trehalózy (Bécard et al. 1991).

Z hlediska této práce je ale zásadnější vliv trehalózy na rostlinu, ačkoliv tvorba a klíčení spor nové interakci mezi oběma symbionty předchází. Hlavním substrátem, z něhož endomykorhizní houba v arbuskulární mykorhize získává uhlík, je pravděpodobně exogenní, resp. rostlinná glukóza (Shachar-Hill et al. 1995). Za pomoci NMR spektroskopie bylo pozorováno, že glukóza dodaná arbuskulárně mykorhizním kořenům exogenně z média je inkorporována jak do rostlinných pletiv, tak do houbového symbionta a je tak možné, že tok uhlíkatých látek probíhá i formou exudace látek do rostlinného symbionta, případně že glukózu přijímají z média oba symbionti (Shachar-Hill et al. 1995; Pfeffer et al. 1999; Bago et al. 2003). Mykorhizní kořeny s inokulovanou arbuskulárně mykorhizní houbou spotřebovávají exogenní glukózu rychleji a ve větším množství, než kořeny nemykorhizované (Shachar-Hill et al. 1995; Harrison 1996). V kořenech tolice *Medicago truncatula* kolonizovaných AM houbou *Glomus versiforme* se výrazně zvýšila abundance transkriptů genu kódujícího rostlinný hexózový přenašeč Mtst1 (*Medicago truncatula* sugar transporter 1), a to především v intenzivně kolonizovaných oblastech kořene (Harrison 1996). To může ukazovat na existenci přídavného uhlíkového sinku tvořeného houbovým symbiontem (např. López et al. 2007). Vzhledem ke zvyšování obsahu trehalózy v mykorhizovaných kořenech v průběhu postupující kolonizace, může být látkou zodpovědnou za tvorbu takového sinku trehalóza (Schubert et al. 1992). Tomu může nasvědčovat i zvyšování obsahu trehalózy v mykorhizovaných kořenech v reakci na stres (Schellenbaum et al. 1998). Pravděpodobně se na tvorbě uhlíkového sinku podílí i další metabolity specifické pro metabolismus hub, jako například manitol, či glykogen (Schubert et al. 1992; Shachar-Hill et al. 1995; Bago et al. 2003). Trehalóza by však mohla být oproti jiným látkám houbového metabolismu vhodnější k tvorbě sinku, protože rostlinný symbiont si ji nemůže dovolit přijmout do svých pletiv ve velkém množství, jelikož v rostlinném metabolismu má trehalóza silný signalizační charakter a ve vysokém množství může být pro rostlinu i toxická (Veluthambi et al. 1981; Eastmond et al. 2002; Schluemann et al. 2004; Gómez et al. 2006).

Důležitá je i otázka, kam v rámci mycelia AM hub směřuje exogenně získaný uhlík. Dodání značené [¹³C]glukózy vedlo k pozorování, že v arbuskulárně mykorhizních kořenech dochází k inkorporaci uhlíku do zásobních a strukturních látek manitolu, glykogenu, glycerolu a trehalózy. Ve vyšších množstvích [¹³C]glukózy v médiu je rezonance patrná i u sacharózy (Shachar-Hill et al. 1995; Pfeffer et al. 1999; Bago et al. 2003). U arbuskulárně mykorhizních kořenů mrkve *Daucus carota* byl pozorován přesun značení i do chitinu (Bago et al. 2003). Rostlinné hexózy tak mohou být v intraradikálním myceliu arbuskulárně mykorhizní houby rychle přeměněny na zásobní látky jako glykogen, či glycerol, a v této formě buďto skladovány, či dále transportovány do extraradikálního mycelia (Pfeffer et al. 1999; Bago et al. 2003). Syntéza glycerolu i glykogenu je ale velice energeticky náročná a navíc by tato forma transportu byla mezi ostatními organismy přinejmenším ojedinělá (Bago et al. 2003). Je tedy pravděpodobné, že se nejedná o jediný způsob translokace uhlíku do extraradikálního mycelia u arbuskulárně mykorhizních hub (Bago et al. 2003). Relevantní pro tuto úvahu je i pozorování přesunu izotopového značení u kořenů póru *Allium porrum*. Dodání značené [¹³C]glukózy vedlo k dvojnásobnému zastoupení ¹³C u nemykorhizovaných kořenů oproti kořenům kolonizovaným AM houbou, což ukazuje na rapidní přesun uhlíku do extraradikálního mycelia houby (Shachar-Hill et al. 1995). Většina přesunu značeného uhlíku se v tomto případě odehrává po časové prodlevě 12-15 hodin od dodání značené glukózy do média, po které nastane až desetinásobný nárůst inkorporace ¹³C do trehalózy a glykogenu (Shachar-Hill et al. 1995). Pravděpodobně je tak transfer uhlíku do houbového mycelia závislý na stavu sacharidů v rostlinných pletivech.

Aby houbový symbiont mohl v mykorhizní asociaci zpracovat rostlinné asimiláty ve svůj prospěch, je nutná přítomnost a aktivita sacharolytických enzymů, schopných rozštěpit rostlinnou sacharózu na hexózy, jež jsou houbovému symbiontu dostupné (Shachar-Hill et al. 1995; Schellenbaum 1998; Bago 2003; Schaarschmidt et al. 2007). Druhy hub účastnící se arbuskulární mykorhizy dle dostupných informací postrádají vlastní invertázy, resp. geny pro jejich syntézu (Schaarschmidt et al. 2007; Parrent et al. 2009), a jsou tak závislé na aktivitě rostlinných invertáz, resp. na přísunu hexóz rostlinou. Arbuskulárně mykorhizní houby pravděpodobně buďto činnost rostlinných invertáz neovlivňují (Schellenbaum et al. 1998), nebo ji ovlivňují jen poměrně mírně (Schaarschmidt et al. 2006), aniž by aktivovaly stresové reakce rostliny. To ukazuje na dobře ustálený mutualistický charakter této symbiózy (např. Kaschuk et al. 2009). Nasvědčují tomu i výsledky experimentu u rostlin *Medicago trunculata* a *Nicotiana tabacum*, kde byla studována závislost mezi obsahem hexóz a kolonizací rostliny arbuskulárně mykorhizní houbou *Glomus intraradices* (Schaarschmidt 2006). Z této studie vyplývá, že nadbytek hexóz dostupný houbě nemá za následek zrychlení a zmohutnění kolonizace rostlinných pletiv myceliem. Opačný stimul, tedy snížení obsahu dostupných hexóz

pro mycelium arbuskulárně mykorhizní houby může mít za následek snížení míry kolonizace pletiv rostlinného symbionta (Schubert et al. 1992). V případě, že je však houba schopna kompenzovat snížené množství rozpustných sacharidů v rostlině zesílením uhlíkového sinku, nemusí ke snížení míry kolonizace dojít (Schellenbaum et al. 1998). Ke snížení obsahu všech rozpustných sacharidů včetně trehalózy dochází v arbuskulárně mykorhizních kořenech například přenesením rostliny do tmy (Schubert et al. 1992). Zmenšení poolu dostupných hexóz tak v tomto případě pravděpodobně nevyvolává zvětšení síly přídavného houbového sinku. Druhé možné vysvětlení může být, že dostupnost hexóz je tak nízká, že ani zvětšení síly sinku nevede k zvýšení míry přenosu látek do mykorhizní houby.

Zvýšení obsahu všech rozpustných sacharidů v mykorhizovaných kořenech bylo pozorováno po dodání většího množství fosforu do růstového média u rostlin pěstovaných na světle. Výjimku mezi rozpustnými sacharidy tvořila v tomto případě trehalóza, jejíž obsah reaguje na situaci stagnací, zatímco v případě nižšího množství dostupného fosforu v médiu obsah trehalózy v mykorhizních kořenech roste (Schubert et al. 1992). Přidaný fosfor může vést k nižší exudaci rostlinných sacharidů do mezilehlého prostoru (Ratnayake et al. 1978, Kaschuk et al. 2009). Tato pozorování ukazují na význam trehalózy v arbuskulárně mykorhizní symbióze, jelikož jako jediný sacharid na změnu dostupnosti fosforu reaguje. Za předpokladu, že trehalóza tvoří přídavný uhlíkový sink AM houbového symbionta, lze spekulovat o částečné kontrole tohoto sinku rostlinou. V tomto případě by byl vyšší přísun fosforu rostlinou reflektován jako potřeba udržet sílu houbového sinku na stejné úrovni, či jako potřeba zastavit další růst intraradikálního mycelia. Je možné, že kontrola rostliny nad touto situací spočívá i v regulaci aktivity přenašečů sacharidů (Harrison 1996). Interakce může být kontrolována také množstvím dusíku dostupného rostlině, či obrannými mechanismy rostliny (Schaarschmidt et al. 2007, Wilson et al. 2007, Kaschuk et al. 2009, Djonović et al. 2013). Přídavný uhlíkový sink v kořenech, tvořený houbovým symbiontem, tak má pravděpodobně sílu úměrnou k míře kolonizace rostlinných pletiv myceliem, velikosti mycelia a poolu rostlinných hexóz, kde tento pool pravděpodobně odráží míru potřeby rostliny investovat do houbového partnera asimiláty.

Trehalóza má v arbuskulární mykorhize úlohu i ve stresových podmínkách (Schellenbaum et al. 1998; Ocón et al. 2007). Teplotní a chemický stres vedou v extraradikálním myceliu AM houby *Glomus intraradices* ke zvýšení obsahu trehalózy, zvýšení aktivity enzymu trehalóza-fosfát syntázy GiTPS i množství mRNA GiTPS2. Zvýšení teploty o 10°C nad optimum *G. intraradices* vedlo až k desetinasobnému nárůstu obsahu trehalózy. Tento teplotní stres vedl u *G. intraradices* i ke zvýšení aktivity neutrální trehalázy GiNTH1. Množství mRNA GiNTH1 vzrostlo až při odeznívání stresové reakce; neutrální trehaláza tak může mít roli v regeneraci po období teplotního stresu (Ocón et al. 2007). Snížení množství vody dostupné kořenům

kukuřice *Zea mays* vedlo k zvýšení obsahu trehalózy a aktivitě trehalázy a invertázy u kořenů této rostliny mykorhizovaných arbuskulárně mykorhizní houbou *Glomus versiforme*, i u kořenů nemykorhizovaných (Schellenbaum et al. 1998). Tyto změny byly kromě trehalázové aktivity výraznější u mykorhizovaných kořenů. Změna v trehalázové aktivitě mohla být vykompenzována opačnou změnou trehalázové aktivity u jednoho ze symbiontů, což vzhledem k nedostatečně přesné metodě nebylo možné ověřit (Schellenbaum et al. 1998). Nedostatek vody, na který kukuřice reagovala snížením rychlosti fotosyntézy, vyvolal v mykorhizovaných kořenech až pětinasobný nárůst obsahu trehalózy (Schellenbaum et al. 1998). Celková odpověď rostliny ukazovala, že zesílením přídatného sinku tvořeného houbovým symbiontem po stresovém stimulu došlo ke zvětšení poolu hexóz. Je zvláštní, že tento pool by měl být generován rostlinnou invertázou, která vykazovala sníženou aktivitu (Schellenbaum et al. 1998). Je také možné, že část naměřené trehalózy pocházela z rostliny a byla syntetizována v odpovědi na osmotický stres (Kaplan et al. 2004; El-Bashiti et al. 2005).

Zvýšení obsahu trehalózy v arbuskulárně mykorhizních kořenech v reakci na stres může být dáno jednak protektivní úlohou tohoto disacharidu (Crowe et al. 1984; Albertorio et al. 2007; da Costa Morato Nery et al. 2008), jednak může představovat reakci houbového symbionta na snížené množství poskytovaných hexóz (Schellenbaum et al. 1998).

2.2.2. Erikoidní mykorhiza

Téma erikoidní mykorhizy je poměrně málo prostudované a výjimkou není ani úloha trehalózy v této symbióze. Směr toku uhlíkatých látek v erikoidní mykorhize probíhá téměř jistě převážně směrem z rostlinného do houbového symbionta (Stribley et al. 1974; Hughes a Mitchell 1995). Narozdíl od většiny ektomykorhizních druhů hub jsou houby účastníci se erikoidní mykorhizy pravděpodobně schopné růst i na médiu obsahujícím jako jediný zdroj uhlíku sacharózu; kromě sacharózy je vhodným zdrojem uhlíku pro tyto houby i glukóza a fruktóza (Stribley et al. 1974; Hughes a Mitchell 1995).

V mykorhizních kořenech rostlin z čeledi Ericaceae kolonizovaných ErM (erikoidně mykorhizními) houbami byl ze sacharidů naměřen nejvyšší obsah sacharózy, trehalózy a manitolu, zatímco v nemykorhizovaných kořenech těchto rostlin nebyly trehalóza ani manitol identifikovány (Stribley et al. 1974; Hughes a Mitchell et al. 1995). V mykorhizovaných kořenech však byl zaznamenán výrazně vyšší obsah sacharózy, než v kořenech nemykorhizovaných, což ukazuje na přítomnost přídatného uhlíkového sinku v mykorhizovaných kořenech, který by mohly tvořit trehalóza a manitol (Stribley a Read 1974). Během růstu mycelia ErM houby *Hymenoscyphus ericae* byl zaznamenán úbytek trehalózy a manitolu, následovaný nárůstem obsahu glukózy a fruktózy v myceliu (Hughes a Mitchell 1995), což může ukazovat

na roli trehalózy a manitolu tvořit pool uhlíku, který je směřován do nově vznikající biomasy. V tomto případě je možné, že syntéza těchto metabolitů vytváří uhlíkový sink v mykorhizách (Hughes a Mitchell 1995).

Schopnost erikoidně mykorhizních hub využít sacharózu je mezi mykorhizními houbami poměrně neobvyklá (Stribley a Read 1974; Hughes a Mitchell 1995; Hughes a Mitchell 1996). Tomu, že jsou ErM houby schopny hydrolyzovat sacharózu, nasvědčuje také identifikace několika typů invertáz u ErM houby *Hymenoscyphus ericeae* (Hughes a Mitchell 1996) a přítomnost genů pro invertázy GH32 (Glycosyl Hydrolase 32 – EC 3.2.1.). Z mnoha studovaných druhů různých hub totiž vykazovalo přítomnost těchto genů jen 5, a z těchto pěti druhů tvoří tři druhy erikoidní typ mykorhizy: *Sebacina incrustans*, *Rhizoscyphus ericae* a *Meliniomyces bicolor* (Parrent et al. 2009). Lze tedy uvažovat o tom, že sink pro uhlíkaté látky vzniká v kořenech kolonizovaných erikoidně mykorhizní houbou jednoduše štěpením sacharózy houbovou invertázou a transportem vzniklých hexóz do houbového mycelia, kde jsou převedeny na trehalózu, manitol, či jiné metabolity.

Změna obsahu jednotlivých sacharidů vyvolaná v mykorhizních pletivech houbou může mít vliv i na metabolismus rostliny. V kořenech klikvy *Vaccinium macrocarpon* kolonizovaných neidentifikovanou ErM houbou byla pozorována zvýšená inkorporace uhlíku do manózových polymerů, oproti kořenům nemykorhizovaným (Stribley et al. 1974). Bohužel není jasné, zda k syntéze docházelo v rostlinných pletivech, či v houbovém myceliu. U kořenů *Glycine max* byl pozorován podobný efekt zvýšení syntézy fruktanu v důsledku zvýšení aktivity sacharóza:sacharóza-1-fruktosyltransferázy (1-SST) a zvýšení aktivity sacharóza:fruktan-6-fruktosyltransferázy (1-SFT) v reakci na zvýšený obsah sacharózy a trehalózy (Müller et al. 2000). Je tedy možné, že sacharóza i trehalóza, které se v mykorhizovaných kořenech vyskytují ve zvýšeném obsahu, způsobují modifikaci aktivity některých enzymů i u ErM rostlin.

2.2.3. Orchideoidní mykorhiza a mykoheterotrofie

Situace kolem translokace uhlíkatých i dalších látek v orchideoidní mykorhize je z velké části neznámá a podléhá stále mnoha diskuzím. Role trehalózy zde však patrně bude dosti odlišná oproti dříve rozebraným typům mykorhizní symbiocy a trehalóza zde může mít rozsáhlý vliv na metabolismus symbiontů. Rostliny orchidejí jsou ve většině případů na houbovém symbiontu do různé míry závislé, a to přinejmenším do doby, než začnou fotosyntetizovat (Smith 1967; Hadley 1984; Alexander a Hadley 1985; Cameron et al. 2006). Všechny druhy orchidejí jsou alespoň v mládí heterotrofní a v této fázi zřejmě dochází k přenosu cukrů převážně ve směru z houby do rostliny (Smith 1967; Hadley a Purves 1974; Alexander a Hadley 1985). V dospělosti ale řada druhů orchidejí fotosyntetizuje a způsob vživy rostliny se mění.

Řada druhů patrně kombinuje přísun uhlíku z mykorrhizní houby s přísunem uhlíku fixovaného fotosyntézou (například Girlanda et al. 2011; Sommer et al. 2012; Stöckel et al. 2014). U menšího množství druhů byl ale v dospělosti pozorován také prakticky výhradní tok z rostliny do mykorrhizní houby (Cameron et al. 2006; Liebel et al. 2014).

S ohledem na orchideoidní mykorrhizu je zásadní schopnost rostlin z čeledi Orchidaceae, u nichž se tento typ mykorrhizy vyskytuje, trehalózu utilizovat (Ernst et al. 1971; Smith 1973; Hadley a Purves 1974; Jheng et al. 2006; Liu et al. 2006; Sopalun et al. 2010). Trehalóza dodaná do média protokormům orchidejí je do různé míry vhodná jako zdroj uhlíku pro jejich růst a v některých případech má vliv i na jejich vývoj. U semenáčků hybridních *Phalaenopsis* je trehalóza k tomuto účelu méně vhodná než glukóza, či fruktóza (Ernst et al. 1971) a podobně je tomu i u protokormů druhů *Dactylorhiza purpurella* a *Bletilla hyacinthina* (Smith 1973). Naopak vhodnějším zdrojem uhlíku pro růst a vývoj protokormů se oproti jiným sacharidům zdá trehalóza být u protokormů druhů *Goodyera repens* (Hadley a Purves 1974), či u protokormů orchideje *Oncidium* „Gower Ramsey“ (Jheng et al. 2006). Reakce rostlin na jednotlivé sacharidy je však pravděpodobně dána kromě druhu rostliny i typem média a zastoupením solí v médiu (Liu et al. 2006). V některých studiích bylo pozorováno, že trehalóza má oproti jiným sacharidům (maltóze a sacharóze) pozitivnější vliv na maturaci PLBs (protocorm-like bodies) a přeměnu PLBs na rostlinky (Jheng et al. 2006; Liu et al. 2006; Sopalun et al. 2010). Výše zmíněná pozorování jsou v kontrastu s častým toxickým, či inhibičním efektem vysokého obsahu trehalózy na rostliny z jiných čeledí (Veluthambi et al. 1981; Eastmond et al. 2002; Schlupepmann et al. 2004; Gómez et al. 2006). Orchideje jsou dnes jediné známé rostliny, u nichž byla schopnost utilizovat exogenní trehalózu ve velkém množství a bez dodání jiných sacharidů pozorována.

Vzhledem k tomu, že trehalóza je jedním z hlavních rozpustných sacharidů v mykorrhizních houbách (např. Smith 1967, Martin et al. 1985; Lewis a Harley 1965a; Hughes a Mitchell 1995), a vzhledem k mnohokrát zaznamenanému směřování toku uhlíkatých látek v orchideoidní mykorrhize z houbového symbionta do rostliny (Smith 1967; Hadley a Purves 1974; Alexander a Hadley 1985; McKendrick et al. 2000; Bougoure et al. 2010), se nabízí úvaha, že orchideje se přizpůsobily příjmu tohoto houbového metabolitu. Jiný houbový metabolit, manitol, se nezdá být vhodným zdrojem uhlíku pro orchideje, jelikož orchideje pravděpodobně většinou nejsou schopny růst na manitolu jakožto jediném zdroji uhlíku (Smith 1973; Hadley a Purves 1974). Trehalóza je tak vhodným kandidátem na látku, jež by v orchideoidní mykorrhize mohla sloužit k přesunu uhlíku do rostliny. Patrně však mohou existovat i výjimky, jak ukázal Nakamura (1982) u protokormů *Galeola septentrionalis*, které manitol využívat umí.

Je otázkou, jak orchideje kolonizované houbou vytvářejí sink pro uhlíkaté látky. Při dodání

značené [¹⁴C]glukózy do media kořenům orchideje *Dactylorhiza purpurella* mykorrhizovaným houbou *Rhizoctonia repens* byl sledován nejprve nárůst značení trehalózy a poté úbytek ve značení trehalózy úměrný nárůstu značení sacharózy (Smith 1967). Bylo by možno uvažovat, že je glukóza nejprve přijata houbovým symbiontem, kde je konvertována na trehalózu, která je pak v rostlinných pletivech převedena na sacharózu (Smith 1967). Specificita sacharózy pro rostlinný metabolismus by mohla dělat ze sacharózy vhodnou látkou pro tvorbu sinku. Je ale možné, že sink je tvořen jednoduše zvýšením rychlosti růstu rostliny a tedy i zvýšenou spotřebou sacharidů, jelikož u mykorrhizovaných orchidejí byl pozorován rychlejší růst pletiv a rychlejší inkorporace sacharidů dodávaných do média (Hadley a Purves 1974; Smith 1967; Hadley 1984; McKendrick et al. 2000). Na druhou stranu stále není jisté, zda příjem látek rostlinným symbiontem probíhá pouze formou lyze houbových pelotonů (Hadley 1984; Bougoure et al. 2010; Bougoure et al. 2014), či zda existuje i jiný, biotrofický mechanismus (Smith 1967; Cameron et al. 2006). Dvě nejnovější studie zabývající se touto problematikou u dvou různých druhů orchidejí došly k rozdílným výsledkům. U druhu *Spiranthes sinensis* zřejmě dochází k přenosu uhlíku z houby do rostliny jak v rostoucích pelotonech, tak během jejich lyze (Kuga et al. 2014). U druhu *Rhizanthella gardneri* však k přenosu uhlíku patrně dochází až během lyze pelotonů (Bougoure et al. 2014). Na tuto otázku tedy neexistuje jednoznačná odpověď a nelze vyloučit, že u různých druhů orchidejí může k přenosu uhlíkatých látek docházet různým způsobem (Selosse 2014). Nehledě na to je vzhledem k signalizační roli trehalózy v metabolismu rostlin, a též i výše zmíněné možné toxicitě vysokých koncentrací trehalózy pro rostliny, důležité rozpoznat, zda je trehalóza v orchidejích štěpena extracelulárně, nebo intracelulárně, či zda ke štěpení dochází ještě v myceliu houbového symbionta. Alternativou by mohla být tolerance orchidejí k vysokému vnitrobuněčnému obsahu trehalózy. Tato otázka však doposud nebyla odděleně řešena a lokalizace a aktivita případných trehaláz v orchideoidní mykorrhize jsou neznámé. Při dodání trehalózy jako jediného sacharidu do média pro semenáčky hybridních *Phalaenopsis* však byl po nějakém čase v médiu naměřen nízký obsah glukózy (Ernst et al. 1971), což by mohlo ukazovat na extracelulární štěpení trehalózy. V souladu s tím je i pozorování u huseníčku *A. thaliana*, kde je trehaláza nejspíše vázaná na plasmalemu a její katalytická doména směřuje do apoplastu (Frison et al. 2007). Výše zmíněné množství glukózy v médiu bylo však vzhledem k množství trehalózy velmi malé, a možnost extracelulárního štěpení je tedy diskutabilní (Ernst et al. 1971). Za povšimnutí stojí i odlišnost v metabolismu škrobu u mykorrhizovaných orchidejí oproti orchidejím nemykorrhizovaným. Bylo pozorováno, že nemykorrhizované rostliny orchidejí akumulují více škrobu, než rostliny mykorrhizované (Hadley a Purves 1974; Hadley 1984). To by mohlo být dáno expozicí mykorrhizovaných rostlin exogenní trehalóze, která snižuje obsah trehalóza-6-

fosfátu v metabolismu různých druhů rostlin (Wingler et al. 2000; Schluempmann et al. 2004; Delatte et al. 2011). T6P v metabolismu rostlin podporuje akumulaci škrobu (např. Wingler et al. 2000; Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006; Martins et al. 2013), a proto snížení jeho obsahu může vést ke snížení obsahu škrobu v mykorhizovaných rostlinách. To by mohlo ukazovat na možnost, že trehalóza houbového původu v metabolismu orchidejí signalizační roli má.

Speciálním typem mykoheterotrofie je epiparazitismus. V této tritrofické interakci je rostlina do různé míry závislá na uhlíku a dalších látkách z jiné rostliny, s níž je propojena myceliem mykorhizní houby (Björkman 1960; Trudell et al. 2003; McKendrick et al. 2000; Bougoure et al. 2010; Bougoure et al. 2014). Mykorhizní houba vytváří v tomto případě orchideoidní (McKendrick et al. 2000; Bougoure et al. 2010; Bougoure et al. 2014), či monotropoidní (Björkman 1960; Trudell et al. 2003) typ mykorhizy s parazitující rostlinou, a s hostitelskou rostlinou tvoří ektomykorhizu, či arbuskulární mykorhizu (Björkman 1960; Bougoure et al. 2010). O této formě interakce je známo jen velmi málo a o biosyntéze trehalózy nejsou v tomto případě informace žádné. Je však pravděpodobné, že situace bude kombinací orchideoidní, či monotropoidní mykorhizy, s ektomykorhizou, či arbuskulární mykorhizou.

2.3. Obecná role trehalózy v mykorhizních asociacích

Je zde třeba uvést, že velké omezení ve výzkumu problematiky úlohy trehalózy v metabolismu mykorhizovaných rostlin představuje fakt, že dosud neexistuje metoda, s jejíž pomocí by šlo lokalizovat malé změny obsahu trehalózy na úrovni buněk (Carillo et al. 2013). Taková metoda by umožnila lepší pochopení situace na fyzickém rozhraní mezi houbovým a rostlinným symbiontem v mykorhizní symbióze. Trehalóza a intermediát její biosyntézy, trehalóza-6-fosfát, silně ovlivňují metabolismus rostlin a řada pozorovaných změn v metabolismu různých druhů rostlin způsobených mykorhizací je podobná účinkům vyvolaným změnami obsahu trehalózy a T6P (Wiemken 2007). Zejména jde o změny v obsahu a poměrném zastoupení sacharidů v mykorhizovaných pletivech (Lewis a Harley 1965a; Schaeffer et al. 1995; Pellny et al. 2004; Martins et al. 2013). Regulace stavu mykorhizace a přesunu látek mezi mykorhizními symbionty by tak mohla být ze strany houby částečně kontrolována skrze exkreci trehalózy, či T6P, do pletiv rostliny (Wiemken 2007). Ačkoliv prozatím takový přesun nebyl zaznamenán, nelze tuto možnost vzhledem k absenci dostatečně přesné metody vyloučit. V parazitických interakcích se trehalóza patogeneze rostlin patrně účastní (Reignault et al. 2001; Brodmann et al. 2002; Renard-Merlier et al. 2007) a následující kapitola věnující se parazitismu zvažuje důsledky této možnosti v symbiotických interakcích.

3. Parazitismus

Fytopatogenní organismy těží z interakce s rostlinami získáním živin hostitele, zatímco infikovaná rostlina z této symbiózy užitek většinou nemá. U parazitů se vyvinula řada mechanismů, pomocí kterých živiny z hostitele získávají. V některých z těchto mechanismů je do různé míry zapojena i trehalóza (Brodmann et al. 2002; Abood a Lösel 2003; Foster et al. 2003; Wilson et al. 2007; Lowe et al. 2009; Gamm et al. 2011; Gravot et al. 2011; Djonović et al. 2013; Song et al. 2014). Parazité z různých, a to i vzájemně velmi vzdálených taxonů, využívají tento disacharid v patogenezi rostlin a k ovlivnění rostlinného metabolismu ve svůj prospěch. Trehalóza se tak jeví jako infekční agens s potenciálem v parazitických interakcích. V této části se budu postupně stručnou formou věnovat situaci u různých skupin organismů, s největším důrazem na fytopatogenní houby.

Oproti mykorrhizní symbióze je úloha trehalózy ve vztahu mezi fytopatogeny a rostlinami lépe prostudována. Na téma parazitismu existuje řada recentních studií, opírajících se o moderní metody, včetně metod genového inženýrství (např. Djonović et al. 2013; Song et al. 2014). Tyto metody byly ve výzkumu role trehalózy v mykorrhizní symbióze doposud využity jen minimálně. Rozdíl v pokročilosti studia je dán pravděpodobně i tím, že mezi rostlinnými hostiteli zmíněných parazitů je mnoho hospodářsky významných plodin. Pochopení úlohy trehalózy v mykorrhizní symbióze však pro produkci zemědělských plodin může být neméně důležité. Je také třeba uvést, že situace navozená infekcí níže zmíněnými fytopatogenními druhy hub se může velmi odlišovat od situace v mykorrhizovaných kořenech, vzhledem k tomu, že uvedené fytopatogenní houby infikují primárně nadzemní část rostliny.

3.1. Parazité rostlin z říše Fungi

Asi nejlépe je prostudována úloha trehalózy u fytopatogenních hub, která je vzhledem k primárnímu zaměření této práce na mykorrhizu pro tuto práci i nejvíce relevantní. Porozumění rozdílům a podobnostem mezi úlohou trehalózy v mykorrhizní symbióze a úlohou trehalózy v parazitických interakcích může vést k lepšímu pochopení významu tohoto disacharidu v rámci symbióz rostlin a hub.

V metabolismu fytopatogenních hub představuje trehalóza důležitou složku (Thrower a Lewis 1973; Foster et al. 2003; Wilson et al. 2007; Lowe et al. 2009; Dulermo et al. 2010; Song 2014). Uhlíkaté látky jsou v parazitických interakcích primárně přesunovány z rostlinného symbionta do mycelia patogena (Thrower a Lewis 1973; Abood a Lösel 2003). Exogenní sacharidy jsou v myceliu fytopatogenních hub následně konvertovány na trehalózu, manitol, arabitól, erythritol, glykogen, glycerol, a jiné převážně houbové metabolity (Thrower a Lewis 1973; Abood a Lösel 2003; Dulermo et al. 2010). Většina patogenů je patrně schopna využít i

sacharózu (např. Parrent et al. 2009), kterou enzymaticky štěpí na hexózy buďto extracelulárně, nebo intracelulárně a tyto jsou následně převáděny na zmíněné metabolity (Gaunt a Manners 1973; Thrower a Lewis 1973; Lam et al. 1995).

Podobně, jako bylo pozorováno u mykorrhizních hub, i u fytopatogenních hub je patrně trehalóza nutná pro sexuální a asexuální reprodukci (Abood a Lösel 2003; Foster et al. 2003; Lowe et al. 2009; Song et al. 2014). Delece genů pro biosyntézu trehalózy tak může mít za následek neschopnost houby sporulovat, či neživotaschopnost spor. I tímto nepřímým způsobem je tak trehalóza nutná pro patogenitu parazita. Biosyntéza trehalózy je s největší pravděpodobností u řady parazitů nutná pro úspěšnou infekci rostlinného hostitele i z dalších důvodů. O roli trehalózy v patogenezí dobře vypovídá pozorování, kdy listy pšenice *Triticum aestivum* ošetřené trehalózovým roztokem formou spreje, vykazovaly téměř úplnou odolnost vůči patogenní houbě *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Reignault et al. 2001; Renard-Merlier et al. 2007). Trehalóza zde patrně u rostliny vyvolává zahájení obranné reakce a v okamžiku reálné infekce je rostlina již vůči patogenu odolná. Tomu nasvědčuje i zvýšení aktivity řady enzymů účastnících se obranných reakcí rostliny, jako fenylalanin-amoniak lyázy (PAL), či peroxidázy (Reignault et al. 2001) a vyšší produkce H₂O₂ (Renard-Merlier et al. 2007) v rostlině v reakci na vnější ošetření prýtu trehalózovým roztokem. Zajímavé je, že enzymy syntézy ligninu ovlivněny nebyly (Reignault et al. 2001). Vhodné by v tomto případě bylo i změření aktivity rostlinné trehalázy, která pravděpodobně bude též zvýšený obsah trehalózy reflektovat, jako bylo pozorováno například u huseníčku *Arabidopsis thaliana* po infekci nádorovkou *Plasmodiophora brassicae* (Brodmann et al. 2002).

Pomocí metod genového inženýrství byl demonstrován význam genů biosyntézy trehalózy u fytopatogenních hub, který byl vyhodnocen za pomoci řady pokročilých metod, jako RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), DNA microarrays, elektronové mikroskopie, apod. Delece genů pro TPS a TPP dochází u fytopatogenních hub ke snížení, až ztrátě schopnosti houby infikovat a poškozovat rostlinu (Foster et al. 2003; Wilson et al. 2007; Lowe et al. 2009; Song et al. 2014). Delece *TPS1* genu u houby *Magnaporthe grisea* vede u infekčních hyf této houby ke ztrátě schopnosti penetrovat pletiva hostitelské rostliny rýže *Oryza sativa* (Foster et al. 2003; Wilson et al. 2007), pravděpodobně v důsledku potřeby trehalózy k vytvoření dostatečného turgoru ve špičce hyfy. Naopak u houby *Staganospora nodorum* tento gen pravděpodobně není pro penetraci intaktních pletiv pšenice *Triticum aestivum* nutný (Lowe et al. 2009). Kromě katalytické aktivity enzymu TPS je však pro zdárnou infekci u *M. grisea* možná důležitá i stavba samotného proteinu (Wilson et al. 2007), ačkoliv není příliš jasný mechanismus tohoto efektu. Důležité úloze TPS v patogenezí nasvědčuje i pozorování, kdy delece *TPS1* genu u fytopatogenní houby *S. nodorum* vedla

k ovlivnění míry exprese 1501 genů (Song et al. 2014).

O významu regulace obsahu trehalózy v patogenitě *M. grisea* vypovídá snížení patogenity delecí genu pro neutrální trehalázu NTH1 (Foster et al. 2003). U *M. grisea* však nebyl studován důsledek delece druhého enzymu *otsA-otsB* biosyntetické dráhy trehalózy, TPP. Delece tohoto genu pravděpodobně povede k hromadění T6P v organismu houby. Vzhledem k tomu, že fytopatogenní houby možná T6P i trehalózu sekretují do hostitelských rostlin (Reignault et al. 2001; Brodmann et al. 2002; Renard-Merlier et al. 2007), ve kterých tyto látky signalizují, bylo by záhodno prošetřit úlohu tohoto proteinu v parazitické interakci. U fytopatogenní houby *Fusarium graminearum* je právě delece genu katalyzujícího konverzi T6P na trehalózu pro patogenitu nejkritičtější, a to v porovnání jak s $\Delta tps1$ mutanty, tak s dvojitými mutanty $\Delta tps1-\Delta tps2$ (enzym TPS2 zde katalyzuje přeměnu T6P na trehalózu podobně jako TPP; Song et al. 2014). Dopad dvojité mutace na patogenitu *S. nodorum* se ukazoval jako nejmírnější. O významu genu *TPS2* pro správnou patogenezí vypovídá ovlivnění míry exprese mnoha genů houby, vyvolané delecí tohoto genu. Delece se projevila u 2781 genů, mezi nimiž byly geny účastníci se syntézy buněčné stěny, mykotoxinů, ale i geny ovlivňující G-proteinové signální kaskády (Song et al. 2014). Geny účastníci se biosyntézy trehalózy jsou tak v metabolismu *S. nodorum* zjevně velmi důležité. Hlavní kvalitativní změny u *S. nodorum* způsobené delecí těchto genů jsou narušení růstu hyf, změněná ultrastruktura buněčné stěny, výrazně snížená odolnost vůči chemickému stresu a neschopnost sporulovat (Lowe et al. 2009; Song et al. 2014). Z hlediska patogenity *S. nodorum* má pravděpodobně největší význam snížená odolnost vůči chemickému stresu, především peroxidu H_2O_2 (Lowe et al. 2009; Song et al. 2014). Obrana rostliny proti fytopatogenním houbám spočívá z velké části právě na produkci vysoce reaktivních látek, jako například H_2O_2 (Renard-Merlier et al. 2007). Neschopnost patogena tyto látky tolerovat může výrazně snížit jeho patogenitu a virulenci vůči rostlině. Dalším doposud nezmíněným pozorovaným důsledkem delece genu *TPS1*, je alespoň u *M. grisea* ztráta schopnosti využít nitráty, a proto mutanti $\Delta tps1$ vyžadují pro růst jiný zdroj dusíku (Wilson et al. 2007). Toto pozorování nelze na základě dostupných dat vysvětlit.

Tok uhlíkatých látek v interakcích mezi rostlinami a parazitickými houbami byl studován pomocí spektroskopických a chromatografických metod. S postupujícím časem od začátku infekce a s rozvojem mycelia klesá v infikovaných pletivech obsah sacharózy, glukózy a fruktózy (Thrower a Lewis 1973; Aked a Hall 1993; Abood a Lösel 2003). Relativně k úbytku těchto sacharidů se zvyšuje podíl houbových metabolitů. Zdá se, že sink je u různých druhů hub tvořen různými houbovými metabolity. Pozorovaná preference pro příjem glukózy u houby z čeledi Erysiphaceae, padlí *Erysiphe pisi*, a vysoký obsah trehalózy v rozpustné složce sacharidů (Aked a Hall 1993) by mohla v tomto pozorování potenciálně ukazovat na roli

trehalózy v tvorbě sinku. Naproti tomu u jiného fytopatogenního druhu z čeledi Erisiphaceae, *Podosphaera xanthii*, byla pozorována větší preference pro příjem fruktózy a většina získaného uhlíku byla inkorporována do manitolu (Abood a Lösel 2003). Identita látky tvořící přídavný houbový sink bude tedy možná záviset na konkrétní interakci. Bez dalších poznatků lze však tuto problematiku stěží diskutovat.

Z výše uvedených informací je patrné, že trehalóza u fytopatogenních hub zastává důležitou úlohu. Rostliny na trehalózu reagují jako na infekční agens a aktivují v odpověď na vysoký obsah trehalózy obranné mechanismy. Tato odpověď rostlin může být dána jednak tím, že trehalóza nějakým způsobem vychyluje metabolismus rostlin ve prospěch patogena (Gam et al. 2011) nebo z důvodu, že velké množství trehalózy značí přítomnost patogena (např. Renard-Merlier et al. 2007), případně obojím. Zdá se však zřejmé, že velké množství trehalózy je pro rostlinu signálem k zahájení modifikací metabolismu (např. Brodmann et al. 2002). Důležitou roli hraje trehalóza i v metabolismu fytopatogenních hub, kde je z patrně velmi komplexních důvodů nutná pro zdárnou infekci hostitele.

3.2. Houbové organismy parazitující na rostlinách

I u některých organismů dříve řazených do říše Fungi, dnes obecně nazývaných houbové organismy, je patrná participace trehalózy a enzymů její biosyntézy v rozvoji chorob rostlin těmito organismy vyvolaných. Rozvoj onemocnění je provázen zvýšením obsahu trehalózy v napadených pletivech i systemicky v celé rostlině a celkovou modifikací metabolismu rostliny (Brodmann et al. 2002; Alix et al. 2007; Gamm et al. 2011; Gravot et al. 2011; Siemens et al. 2011).

Jedním z houbových organismů, u nichž se trehalóza podílí na infekci rostliny, je nádorovka *Plasmodiophora brassicae* z říše Rhizaria. Rostliny huseníčku *Arabidopsis thaliana* v odpověď na napadení tímto patogenem odpovídají mimojiné zvýšením exprese genů kódujících trehalázu AtTRE1 a zvýšením trehalázové aktivity (Brodmann et al. 2002; Gravot et al. 2011), a to ještě před tím, než v rostlinných pletivech dojde k akumulaci trehalózy. Reakce rostliny tak ukazuje spíše na přímý negativní vliv exogenní trehalózy na metabolismus rostlin. Tomu odpovídá i pozorované zvýšení míry exprese genů kódujících u *P. brassicae* enzymy biosyntézy trehalózy (Brodmann et al. 2002), zejména *PbTPS* při infekci hostitele. Otázkou je, jakým konkrétním způsobem nádorovka rostlině v kořenech škodí. Kromě obsahu trehalózy se v napadených kořenech markantně zvyšuje obsah škrobu, ačkoliv trehalóza v tomto případě pravděpodobně přímo neovlivňuje expresi genů kódujících ADPG-pyrofosforylázu (Brodmann et al. 2002). Opět se nabízí možnost, že trehalóza slouží nádorovce k tvorbě uhlíkového sinku v napadených pletivech, ačkoliv o tomto tvrzení lze pouze spekulovat. Existuje několik genotypů

huseníčku *A. thaliana*, které vykazují částečnou toleranci k napadení *P. brassicae* (Alix et al. 2007; Gravot et al. 2011). U genotypu Bur-0 (Burren-0), vykazujícího největší odolnost vůči tomuto patogenovi, byla pozorována především zvýšená odolnost vůči velkému množství trehalózy, přičemž souvislost mezi touto odolností a expresí genů biosyntézy trehalózy nebyla QTL (quantitative trait locus) testem prokázána (Gravot et al. 2011). Z této studie se také zdá, že aktivita trehalázy nezodpovídá za toleranci daného genotypu k napadení nádorovkou. Odolnost rostliny je tak dána pravděpodobně jiným, neznámým způsobem.

Jiným houbovým organismem, u něhož bylo pozorováno propojení mezi biosyntézou trehalózy a infekcí rostliny, je vřetenatka *Plasmopara viticola* z říše Chromalveolata. I zde dochází k rozsáhlému ovlivnění metabolismu rostliny (Gamm et al. 2011), v tomto případě u révy *Vitis vinifera*. V infikovaných listech byl pozorován zvýšený obsah trehalózy, trehalázová aktivita a zvýšený transport hexóz do infikovaných pletiv, ukazující na přítomnost uhlíkového sinku (Gamm et al. 2011). V infikovaných listech byl stejně jako u nádorovky *P. brassicae* akumulován škrob, ale vřetenovka v tomto případě pravděpodobně i přímo zvyšuje aktivitu ADPG-pyrofosforylázy (Brodman et al. 2002; Gamm et al. 2011). V infikovaných listech byla ale pozorována snížená fotosyntetická aktivita, způsobená snížením míry exprese genů zodpovědných za syntézu součástí fotosyntetického aparátu a zvýšením míry exprese genu kódujícího chlorofylázu (Gamm et al. 2011). Takového ovlivnění se trehalóza nejspíše neúčastní, jelikož pravděpodobně míru fotosyntézy zvyšuje (Pellny et al. 2004). Ovlivnění metabolismu škrobu však může být přímým důsledkem sekrece T6P do pletiv rostliny. Vysoký obsah T6P by pak by mohl vést k akumulaci škrobu, podobně jako bylo pozorováno u rostlin napadených nádorovkou, či vřetenatkou (Wingler et al. 2000; Lunn et al. 2006; Ramon et al. 2007; Martins et al. 2013).

U parazitů řadících se mezi houbové organismy je patrný vliv trehalózy na infekci rostlin. Metabolismus takto napadených rostlin je značně modifikován, a vzhledem k výrazně zvýšenému obsahu trehalózy a změnám v míře exprese genů zapojených do biosyntézy trehalózy v napadených pletivech je možné, že trehalóza se vyvolání těchto změn účastní, ačkoliv většinou není přesně známo jakým způsobem.

3.3. Další parazité rostlin

Rostliny jsou parazitovány organismy z mnoha taxonomických skupin. Role trehalózy v těchto parazitických interakcích byla pozorována kromě hub a houbových organismů i u bakterií a bezobratlých živočichů.

V metabolismu bakterií se trehalóza běžně vyskytuje (Müller et al. 1998; Nishimoto et al. 1995; De Smet et al. 2000; Djonović et al. 2013; Poueymiro et al. 2014) a je důležitá i v parazitických interakcích s rostlinami. Delecí genů kódujících enzymy biosyntézy trehalózy *treYZ* a *treS* u *Pseudomonas aeruginosa* vznikli mutanti neschopní patogeneze huseníčku *Arabidopsis thaliana* (Djonović et al. 2013). U jiné fytopatogenní bakterie, *Ralstonia solanacearum*, je přímo do buněk napadené rostliny injikován jako součást bakteriálního efektoru typu III enzym ripTPS (Poueymiro et al. 2014). Velké množství trehalózy v kolonizovaných pletivech *Glycine max* vytváří i některé kmeny mutualistické bakterie *Bradyrhizobium japonicum* (Müller et al. 1998). Všechny tyto bakterie ovlivňují metabolismus rostlin. Může tomu tak být i v závislosti na množství produkované trehalózy (Müller et al. 1998). To, že zvýšený obsah trehalózy značí pro rostlinu přítomnost patogena, je poměrně zjevné (Reignault et al. 2001; Renard-Merlier et al. 2007). Rostliny *Nicotiana tabacum* dokonce reagují zahájením hypersenzitivní odpovědi v reakci nikoliv na zvýšený obsah trehalózy, ale přímo na přítomnost části C-terminální domény enzymu ripTPS (Poueymiro et al. 2014). To dobře odráží, jak rostlina cizorodou trehalózu reflektuje. Nabízí se interpretace, že v tomto případě, kde je do rostliny injikován enzym odlišný od rostlinného enzymu TPS, rostlina není nucena reagovat až na zvýšení obsahu trehalózy nad fyziologickou úroveň (Poueymiro et al. 2014). Molekuly trehalózy pocházející od patogena a pocházející z metabolismu rostlin nemůže rostlina rozeznat, identifikace cizorodého enzymu je snazší. Jde však pouze o spekulaci.

U zmíněných mutantů bakterie *P. aeruginosa*, neschopných biosyntézy trehalózy, bylo pozorováno navrácení patogenity po delecí genů pro syntézu xyloglukanů a simultánním exogenním dodáním trehalózy, nitrátů a amoniaku (Djonović et al. 2013). Zdá se tedy, že z neznámých důvodů je pro odolnost vůči infekci touto bakterií nutná intaktní buněčná stěna a dostatek dusíkatých látek. Dodány byly nitráty a amoniak, které jinak v apoplastu nejsou hojné (Djonović et al. 2013). Tyto výsledky lze dát do volného kontextu s výsledky jiných studií. Bylo pozorováno, že velké množství trehalózy u kokotice *Cuscuta reflexa* způsobuje inhibici syntézy buněčné stěny (Veluthambi et al. 1982). U fytopatogenní houby *Magnaporthe Grisea*, jak zmíněno dříve, je trehalóza pravděpodobně nutná pro utilizaci nitrátů (Wilson et al. 2007), což by mohlo ukazovat spíše na to, že navrácení patogenity mutantní *P. aeruginosa* souviselo s dodáním amoniaku, ačkoliv metabolismy dané bakterie a houby se mohou v tomto ohledu markantně lišit. Trehalóza produkovaná patogenem by mohla mít roli v narušení biosyntézy

buněčné stěny rostliny a zpřístupnění intracelulárního obsahu bakterií. I zde je však otázkou, zda může k inhibici syntézy buněčné stěny docházet i u jiných rostlin.

Metabolismus bezobratlých živočichů obsahuje jako jednu ze základních složek i trehalózu (např. Candy a Kilby 1961; Murphy a Wyatt 1965), která se možná účastní i patogeneze rostlin. Pomocí metabolického mapování byl pozorován vysoký obsah trehalózy a 1-kestózy v syncytiích tvořených fytopatogenní hlísticí *Heterodera schachtii* u rostlin *Arabidopsis thaliana* (Hofmann et al. 2010), není však známa funkce trehalózy v této interakci. Jiný pohled na úlohu trehalózy v metabolismu rostlin nabízí pozorování vysoce signifikantního systemického zvýšení obsahu trehalózy u *Arabidopsis thaliana* v důsledku infekce mšicemi rodu *Myzus persicae* (Hodge et al. 2013). Z tohoto výsledku lze vyvozovat, že trehalóza má v metabolismu rostliny v této interakci obranný charakter (Hodge et al. 2013). Je tedy možné spekulovat, že rostlina reaguje specificky na napadení bezobratlými organismy zvýšením obsahu trehalózy.

3.4. Obecná role trehalózy v parazitických interakcích

Vzhledem k tomu, že se trehalóza většinou vyskytuje v metabolismu všech uvedených skupin fytopatogenních parazitů ve výrazně větších množstvích, než v metabolismu rostlin, a vzhledem k odlišné povaze této molekuly v metabolismu rostlin a v metabolismu zmíněných parazitů, lze spekulovat o výhodě trehalózy jakožto infekčního agens v patogenezi rostlin (např. Gamm et al. 2011). Signalizační role trehalózy u rostlin činí z trehalózy vhodnou látku pro vychýlení metabolismu rostliny ve prospěch patogena (Brodmann et al. 2002). Pravděpodobně existuje „aktivační“ množství trehalózy, kterou rostlina reflektuje jako narušení homeostáze a reaguje na ni spuštěním obranných a stresových mechanismů (Reignault et al. 2001; Renard-Merlier et al. 2007). Aktivačním obsahem je myšlen takový obsah trehalózy, který vede ke specifické změně genové exprese odrážející napadení parazitem. Vzhledem k tomu, že bazální aktivita trehaláz v metabolismu rostlin je nejpíše druhově a orgánově specifická (Veluthambi et al. 1981; Wolska-Mitaszko a Molestak 2005), může být i „aktivační“ obsah trehalózy specifický pro každý druh a orgán.

4. Závěr

Úloha trehalózy se liší v rámci jednotlivých typů symbiotických vztahů mezi rostlinami a houbami, případně i mezi rostlinami a jinými organismy. Velmi dobře konzervovanou schopností trehalózy je schopnost vytvářet přídavný uhlíkový sink, jenž posiluje přesun uhlíkatých látek směrem do houbového symbionta. V mykorhizní symbióze je tento sink regulován oběma symbiotickými partnery, zatímco v parazitických interakcích je výrazně více regulován houbovým symbiontem. Síla sinku tvořeného trehalózou a jeho regulace, společně s dalšími ukazateli, tak může reflektovat charakter vztahu mezi symbionty. Odlišná situace nastává v těch typech mykorhizy, kde probíhá přesun uhlíkatých látek převážně směrem opačným, a kde může být trehalóza pocházející z houbového symbionta využívána symbiotickou rostlinou.

Trehalóza a její intermediát trehalóza-6-fosfát mohou sloužit patrně velmi komplexním způsobem jako patogenní agens, jež je alespoň u některých parazitických druhů nutné k standardnímu průběhu patogeneze. Metabolismus napadené rostliny je těmito disacharidy zjevně modifikován. Není však vyloučeno, že exogenní trehalóza a T6P neovlivňují podobným způsobem i metabolismus mykorhizních rostlin, a to i v těch typech mykorhizní symbiózy, kde dochází k přesunu uhlíkatých látek směrem k houbovému symbiontu.

Vliv trehalózy na metabolismus mykorhizovaných rostlin, případně úloha rostlinné trehalózy v mykorhizní symbióze a parazitických interakcích jsou témata hodná dalšího studia. Trehalóza je sacharid, jež v metabolismu obou symbiontů hraje význačnou roli. Zdá se tedy být zjevné, že může při fyzickém propojení symbiontů sloužit jako komunikační a možná i manipulační agens. Další studium by mělo zahrnovat využití velmi citlivých a specifických metod a metod molekulární genetiky k jasnějšímu pochopení intenzity zapojení tohoto disacharidu do ovlivnění metabolismu symbiotických partnerů.

Použitá literatura

- Abood JK, Lösel DM.** 2003. Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. *Plant Pathology* **52**, 256–265.
- Adams RP, Kendall E, Kartha KK.** 1990. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**, 107–110.
- Aked J, Hall JL.** 1993. The uptake of glucose, fructose and sucrose into pea powdery mildew (*Erysiphe pisi* DC) from the apoplast of pea leaves. *New Phytologist* **123**, 277–282.
- Albertorio F, Chapa VA, Chen X, Diaz AJ, Cremer PS.** 2007. The α,α -(1-1) linkage of trehalose is key to anhydrobiotic preservation. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 10567–10574.
- Alexander C, Hadley G.** 1985. Carbon Movement between Host and Mycorrhizal Endophyte During the Development of the Orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist* **101**, 657–665.
- Alix K, Lariagon C, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ.** 2007. Exploiting natural genetic diversity and mutant resources of *Arabidopsis thaliana* to study the *A. thaliana-Plasmodiophora brassicae* interaction. *Plant Breeding* **126**, 218–221.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G.** 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC evolutionary biology* **6**, 109.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y.** 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant physiology* **131**, 1496–1507.
- Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE.** 1991. Identification and Quantification of Trehalose in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi by In vivo C-13 NMR and HPLC Analyses. *New Phytologist* **118**, 547–552.
- Belocopitow E, Maréchal LR.** 1970. Trehalose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **198**, 151–154.
- Bianchi G, Gamba A, Limiroli R, Pozzi N, Elster R, Salamini F.** 1993. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum* **87**, 223–226.
- Björkmann E.** 1960. *Monotropa Hypopitys* L. - an Epiparasite on Tree Roots. *Physiologia Plantarum* **13**, 308–327.
- Blázquez M a, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM.** 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS letters* **329**, 51–54.
- Blázquez MA, Santos E, Flores C-L, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C.** 1998. Isolation and Molecular Characterization of the Arabidopsis TPS1 Gene, Encoding Trehalose-6-Phosphate Synthase. *The Plant Journal* **13**, 685–689.
- Bougoure JJ, Brundrett MC, Grierson PF.** 2010. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytologist* **186**, 947–956.
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, Cliff J, Clode P, Kilburn M, Grierson P.** 2014. High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell and Environment* **37**, 1223–1230.
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmölling T.** 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant journal : for cell and molecular biology* **44**, 314–33.
- Brodmann A, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher R a, Wiemken A, Boller T, Wingler A.** 2002. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**, 693–700.
- Cabib E, Leloir LF.** 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of biological chemistry* **231**, 259–275.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ.** 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: Evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**, 405–416.
- Candy DJ, Kilby BA.** 1961. The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *Biochemical journal* **78**, 531–536.
- Carillo P, Feil R, Gibon Y, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Bläsing OE, Stitt M, Lunn JE.** 2013. A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. *Plant methods* **9**, 21.

- Ceccaroli P, Buffalini M, Saltarelli R, Barbieri E, Polidori E, Ottonello S, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Stocchi V.** 2011. Genomic profiling of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New phytologist* **189**, 751–64.
- Corrêa A, Hampp R, Magel E, Martins-Loução MA.** 2011. Carbon allocation in ectomycorrhizal plants at limited and optimal N supply: An attempt at unraveling conflicting theories. *Mycorrhiza* **21**, 35–51.
- Da Costa Morato Nery D, da Silva CG, Mariani D, Fernandes PN, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC a.** 2008. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1780**, 1408–1411.
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D.** 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science (New York, N.Y.)* **223**, 701–703.
- Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluempmann H.** 2011. Growth Arrest by Trehalose-6-Phosphate: An Astonishing Case of Primary Metabolite Control over Growth by Way of the SnRK1 Signaling Pathway. *Plant physiology* **157**, 160–174.
- Deveau a., Brulé C, Palin B, Champmartin D, Rubini P, Garbaye J, Sarniguet a., Frey-Klett P.** 2010. Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BbC6R8. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 560–568.
- Van Dijken AJH, Schluempmann H, Smeekens SCM.** 2004. Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant physiology* **135**, 969–77.
- Djonović S, Urbach JM, Drenkard E, et al.** 2013. Trehalose biosynthesis promotes *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in plants. *PLoS pathogens* **9**, e1003217.
- Drennan PM, Smith MT, Goldsworthy D, van Staden J.** 1993. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. *Journal of Plant Physiology* **142**, 493–496.
- Dulermo T, Rascle C, Billon-Grand G, Gout E, Bligny R, Cotton P.** 2010. Novel insights into manitol metabolism in the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Biochemical journal* **427**, 323–332.
- Duponnois R, Kisa M.** 2006. The possible role of trehalose in the mycorrhiza helper bacterium effect. *Canadian Journal of Botany* **84**, 1005–1008.
- Eastmond PJ, van Dijken AJH, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDG, Smeekens SC, Graham IA.** 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant Journal* **29**, 225–235.
- EI-Bashiti T, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M.** 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science* **169**, 47–54.
- Elbein AD.** 1968. Trehalose phosphate synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*: purification of guanosine diphosphate D-glucose: D-glucose-6-phosphate 1-glucosyl-transferase. *Journal of Bacteriology* **96**, 1623–1631.
- Ernst R, Arditti J, Healey PL.** 1971. Carbohydrate Physiology of Orchid Seedlings. II. Hydrolysis and Effects of Oligosaccharides. *American Journal of Botany* **58**, 827-835.
- Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ.** 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO Journal* **22**, 225–235.
- Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, François J, Chaumont F, Batoko H.** 2007. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS letters* **581**, 4010–6.
- Gamm M, Héloir M-C, Bligny R, et al.** 2011. Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **24**, 1061–1073.
- Garcia A, Engler J, Iyer S, Gerats T, VanMontagu M, Caplan A.** 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant physiology* **115**, 159–169.
- Gaunt RE, Manners JG.** 1973. Production of Trehalose and Polyols by *Ustilago Nuda* in Culture and Their Utilization in Healthy and Infected Wheat Plants. *New Phytologist* **72**, 321–327.
- Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, Cozzolino S, Gebauer G, Perotto S.** 2011. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations1. *American Journal of Botany* **98**, 1148–1163.
- Goddijn OJ, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RW, de Graaf PT, van Dun K, Poels J, Ponstein AS, Damm B, Pen J.** 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic

plants. *Plant physiology* **113**, 181–190.

Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA. 2006. Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant Journal* **46**, 69–84.

Gravot A, Grillet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzaneres-Dauleux MJ. 2011. Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. *New phytologist* **191**, 1083–94.

Gussin AES, McCormack JH. 1970. Trehalase and the enzymes of trehalose biosynthesis in *Lilium longiflorum* pollen. *Phytochemistry* **9**, 1915–1920.

Gussin a E, McCormack JH, Waung LY, Gluckin DS. 1969. Trehalase: a new pollen enzyme. *Plant physiology* **44**, 1163–1168.

Hadley G. 1984. Uptake of [¹⁴C]glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms. *New Phytologist* **96**, 263–273.

Hadley G, Purves S. 1974. Movement of C-14 from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* **73**, 475–482.

Hanbury D. 1859. Note on Two Insect-Products from Persia. *Journal of the proceedings of the Linnean society* **3**, 178–183.

Harrison MJ. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant journal : for cell and molecular biology* **9**, 491–503.

Hodge S, Ward JL, Beale MH, Bennett M, Mansfield JW, Powell G. 2013. Aphid-induced accumulation of trehalose in *Arabidopsis thaliana* is systemic and dependent upon aphid density. *Planta* **237**, 1057–1064.

Hofmann J, El Ashry AN, Anwar S, Erban A, Kopka J, Grundler F. 2010. Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *Plant Journal* **62**, 1058–1071.

Van Houtte H, Vandesteene L, López-Galvis L, Lemmens L, Kissel E, Carpentier S, Feil R, Avonce N, Beeckman T, Lunn JE, Van Dijck P. 2013. Overexpression of the trehalase gene AtTRE1 leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and is involved in abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant physiology* **161**, 1158–71.

Hughes E, Mitchell DT. 1995. Utilization of sucrose by *Hymenoscyphus ericae* (an ericoid endomycorrhizal fungus) and ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* **99**, 1233–1238.

Hughes E, Mitchell DT. 1996. Properties of invertases in mycelium of *Hymenoscyphus ericae* and in endomycorrhizal association with cranberry seedlings. *Mycological Research* **100**, 1197–1203.

Hynson NA, Preiss K, Gebauer G, Bruns TD. 2009. Isotopic evidence of full and partial myco-heterotrophy in the plant tribe Pyroleae (Ericaceae). *New phytologist* **182**, 719–26.

Chen X, Hampp R. 1993. Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus, *Amanita muscaria* (L. ex fr.) Hooker. *New phytologist* **125**, 601–608.

Ilhan S, Ozdemir F, Bor M. 2015. Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant biology* **17**, 402–7.

Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CHH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant physiology* **131**, 516–24.

Jheng FY, Do YY, Liauh YW, Chung JP, Huang PL. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science* **170**, 1133–1140.

Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **136**, 4159–4168.

Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar P a., Hungria M, Giller KE. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 1233–1244.

Kerner R, Delgado-Eckert E, Del Castillo E, Müller-Starck G, Peter M, Kuster B, Tisserant E, Pritsch K. 2012. Comprehensive proteome analysis in *Cenococcum geophilum* Fr. as a tool to discover drought-related proteins. *Journal of Proteomics* **75**, 3707–3719.

- Kizawa H, Miyagawa K, Sugiyama Y.** 1995. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Micrococcus varians*. Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry **59**, 1908–1912.
- Koch EM, Koch FC.** 1925. The presence of trehalose in yeast. Science **61**, 570–2.
- Koide RT, Shumway DL, Stevens CM.** 2000. Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi. Mycological Research **104**, 834–840.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluempmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P.** 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**, 11118–11123.
- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H.** 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pellets transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. New phytologist **202**, 594–605.
- Kuo A, Kohler A, Martin FM, Grigoriev I V.** 2014. Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. Frontiers in Microbiology **5**, 1–7.
- Lam CK, Belanger FC, White JF, Daie J.** 1995. Invertase activity in *Epichloë/Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. Mycological Research **99**, 867–873.
- Lancellotti E, Iotti M, Zambonelli A, Franceschini A.** 2014. Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. Mycorrhiza **24**, 481–6.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ.** 2001. Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ¹⁴C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. Tree physiology **21**, 71–82.
- Leloir LF, Cabib E.** 1953. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. Journal of the American Chemical Society **75**, 5445–5446.
- Lewis DH, Harley JL.** 1965a. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. I. Identity of endogenous sugars and utilization of exogenous sugars. New Phytologist **64**, 224–237.
- Lewis DH, Harley JL.** 1965b. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. II. Utilization of exogenous sugars by uninfected and mycorrhizal roots. New Phytologist **64**, 238–255.
- Lewis DH, Harley JL.** 1965c. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between host and fungus. New Phytologist **64**, 256–269.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM.** 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. Trends in Plant Science **6**, 510–513.
- Liebel HT, Bidartondo MI, Gebauer G.** 2014. Are carbon and nitrogen exchange between fungi and the orchid *Goodyera repens* affected by irradiance? Annals of botany **115**, 251–261.
- Liu TH, Lin JJ, Wu RY.** 2006. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **86**, 125–129.
- López MF, Männer P, Willmann A, Hampp R, Nehls U.** 2007. Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. New Phytologist **174**, 389–398.
- Lowe RGT, Lord M, Rybak K, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS.** 2009. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*. Fungal Genetics and Biology **46**, 381–389.
- Lunn JE.** 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. Functional Plant Biology **34**, 550–563.
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M.** 2014. Trehalose metabolism in plants. Plant Journal **79**, 544–567.
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M.** 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical journal **397**, 139–148.
- Martin F, Boiffin V, Pfeffer PE.** 1998. Carbohydrate and Amino Acid Metabolism in the *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhiza during Glucose Utilization 1. , 627–635.
- Martin F, Canet D, Marchal JP.** 1985. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Study of manitol Cycle and Trehalose Synthesis during Glucose Utilization by the Ectomycorrhizal Ascomycete *Cenococcum graniforme*. Plant physiology **77**, 499–502.

- Martins MCM, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh S, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE.** 2013. Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant physiology* **163**, 1142–63.
- Maruta K, Hattori K, Nakada T, Kubota M, Sugimoto T, Kurimoto M.** 1996. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **60**, 717–720.
- McKendrick LS, Leake JR, Read DJ.** 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* **145**, 539–548.
- Müller J, Aeschbacher R a, Sprenger N, Boller T, Wiemken a.** 2000. Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant physiology* **123**, 265–274.
- Müller J, Boller T, Wiemken A.** 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Journal of Plant Physiology* **153**, 255–257.
- Murphy A, Wyatt GR.** 1965. The Enzymes of Glycogen in Silk Moth and Trehalose Fat Body Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **240**, 1500–1508.
- Nakada T, Maruta K, Tsusaki K, Kubota M, Chaen H, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y.** 1995. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* **59**, 2210–2214.
- Nakamura SJ.** 1982. Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*. *New Phytologist* **90**, 701–715.
- Niederer M, Pankow W, Wiemken A.** 1989. Trehalose synthesis in mycorrhiza of norway spruce - an indicator of vitality. *European Journal of Forest Pathology* **19**, 14–20.
- Nishimoto T, Nakano, Ikegami S, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y.** 1995. Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* **59**, 2189–2190.
- Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y.** 1996. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp R48. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* **60**, 640–644.
- Ocón A, Hampp R, Requena N.** 2007. Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**, 879–891.
- Parrent JL, James TY, Vasaitis R, Taylor AF.** 2009. Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC evolutionary biology* **9**, 148.
- Paul MJ, Jhurrea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, Schluempmann H, Wingler A.** 2010. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant signaling & behavior* **5**, 386–392.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y.** 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annual review of plant biology* **59**, 417–41.
- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluempmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, Paul MJ.** 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 71–82.
- Pfeffer PE, Douds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y.** 1999. Carbon Uptake and the Metabolism and Transport of Lipids in an Arbuscular Mycorrhiza1. *Plant physiology* **120**, 587–598.
- Poueymiro M, Cazalé a C, François JM, Parrou JL.** 2014. A *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Directs the Production of the Plant Signal Metabolite Trehalose-6-Phosphate. **5**, 1–9.
- Qu Q, Lee SJ, Boos W.** 2004. TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyper-thermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of biological chemistry* **279**, 47890–7.
- Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, Van Dijck P, Leyman B.** 2007. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* **63**, 195–206.
- Rangel-Castro JI, Danell E, Pfeffer PE.** 2002. A ¹³C-NMR Study of Exudation and Storage of Carbohydrates and Amino Acids in the Ectomycorrhizal Edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycologia* **94**, 190.
- Ratnayake M, Leonard R, Menge J.** 1978. Root Exudation in Relation to Supply of Phosphorus

and its Possible Relevance to Mycorrhizal Formation. *New Phytologist* **81**, 543–552.

Reignault P, Cogan a., Muchembled J, Lounes-Hadj Sahraoui A., Durand R, Sancholle M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist* **149**, 519–529.

Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R, Reignault P. 2007. Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* **68**, 1156–1164.

Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS microbiology letters* **296**, 52–9.

Salzer P, Hager A. 1993. Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bound proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L) Karst) cells. *Trees - Structure and Function* **8**, 49–55.

Secks ME, Richardson MD, West CP, Marlatt ML, Murphy JB. 1999. Role of trehalose in desiccation tolerance of endophyte-infected tall fescue. *Horticultural Studies*, 134-140.

Selosse M-A. 2014. The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe. *New phytologist* **202**, 337–40.

Selosse M-A, Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 15–20.

Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995. Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant physiology* **108**, 7–15.

Shi L, Guttenberger M, Kottke I, Hampp R. 2002. The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): Changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *Mycorrhiza* **12**, 303–311.

Schaarschmidt S, González M-C, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B. 2007. Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant physiology* **143**, 1827–1840.

Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B. 2006. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4015–4023.

Schaeffer C, Wallenda T, Guttenberger M, Hampp R. 1995. Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. *New Phytologist* **129**, 417–424.

Schellenbaum L, Müller J, Boller T, Wiemken A, Schuepp H. 1998. Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytologist* **138**, 59–66.

Schluepman H, Dijken A Van, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M. 2004. Trehalose Mediated Growth Inhibition of *Arabidopsis* Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation 1. *Plant physiologist* **135**, 879–890.

Schubert A, Wyss P, Wiemken A. 1992. Occurrence of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *Journal of Plant Physiology* **140**, 41–45.

Siemens J, González MC, Wolf S, Hofmann C, Greiner S, Du Y, Rausch T, Roitsch T, Ludwig-Müller J. 2011. Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **12**, 247–262.

De Smet KAL, Weston A, Brown IN, Young DB, Robertson BD. 2000. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* **146**, 199–208.

Smith SE. 1967. Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* **66**, 371–378.

Smith SE. 1973. Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin. *New Phytologist* **72**, 497–499.

Söderström B, Finlay RD, Read DJ. 1988. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants IV. Qualitative analysis of carbohydrate contents of mycelium interconnecting host plants. *New Phytologist* **109**, 163–166.

Sommer J, Pausch J, Brundrett MC, Dixon KW, Bidartondo MI, Gebauer G. 2012. Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian Orchids. *American Journal of Botany* **99**, 1133–1145.

- Song XS, Li HP, Zhang JB, Song B, Huang T, Du XM, Gong AD, Liu YK, Feng YN, Agboola RS, Liao YC.** 2014. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for development, virulence and mycotoxin biosynthesis apart from trehalose biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* **63**, 24–41.
- Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K.** 2010. Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**, 143–150.
- Stöckel M, Těšitelová T, Jersáková J, Bidartondo MI, Gebauer G.** 2014. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist* **202**, 606–615.
- Stribley DP, Read DJ.** 1974. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae III. Movement of carbon from host to fungus. *New Phytol* **73**, 73–74.
- Thrower LB, Lewis DH.** 1973. Uptake of Sugars by *Epichloe typhina* (Pers. Ex Fr.) Tul. in Culture and from its Host, *Agrostis stolonifera* L. *New Phytologist* **72**, 501–508.
- Tibbett M, Sanders FE, Cairney JWG.** 2002. Low-temperature-induced changes in trehalose, manitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza* **12**, 249–255.
- Trudell S a., Rygiewicz PT, Edmonds RL.** 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* **160**, 391–401.
- Veiga RSL, Faccio A, Genre A, Pieterse CMJ, Bonfante P, Van der Heijden MG a.** 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce growth and infect roots of the non-host plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **36**, 1926–1937.
- Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R.** 1981. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*: Correlation with low trehalase activity. *Plant physiology* **68**, 1369–1374.
- Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R.** 1982. Trehalose Toxicity in *Cuscuta reflexa*: Cell Wall Synthesis Is Inhibited upon Trehalose Feeding. *Plant physiology* **70**, 686–688.
- Vogel G, Aeschbacher RA, Muller J, Boller T, Wiemken A.** 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant Journal* **13**, 673–683.
- Wannet WJB, Hermans JHM, Van Der Drift C, Op Den Camp HJM.** 2000. HPLC detection of soluble carbohydrates involved in manitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 287–291.
- Wannet WJB, Op den Camp HJM, Wisselink HW, van der Drift C, Van Griensven LJLD, Vogels GD.** 1998. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1425**, 177–188.
- Wiemken V.** 2007. Trehalose synthesis in ectomycorrhizas - a driving force of carbon gain for fungi? *New phytologist* **174**, 228–30.
- Wilson RA, Jenkinson JM, Gibson RP, Littlechild JA, Wang ZY, Talbot NJ.** 2007. Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *EMBO Journal* **26**, 3673–3685.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA.** 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *Apl3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **124**, 105–114.
- Wisser G, Guttenberger M, Hampp R, Nehls U.** 2000. Identification and characterization of an extracellular acid trehalase from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist* **146**, 169–175.
- Wolska-Mitaszko B, Molestak, E MW.** 2005. Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa*. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**, 53–60.
- Yadav UP, Ivakov A, Feil R, et al.** 2014. The sucrose – trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. **65**, 1051–1068.
- Yang HL, Liu YJ, Wang CL, Zeng QY.** 2012. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and *rice*. *PloS one* **7**, e42438.
- Zaparty M, Hagemann A, Bräsen C, Hensel R, Lupas AN, Brinkmann H, Siebers B.** 2013. The first prokaryotic trehalose synthase complex identified in the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *PloS one* **8**, e61354.